

Universidad Pública de Navarra

Departamento de Ciencias del Medio Natural



TESIS DOCTORAL

Dinámica de las bacterias lácticas en el queso DOP Ossau-Iraty elaborado con leche cruda: Uso de cepas salvajes de *Lactococcus lactis* en fabricación artesanal

/

Dynamique des bactéries lactiques dans le fromage AOP Ossau-Iraty au lait cru : Utilisation de souches sauvages de *Lactococcus lactis* en fabrication fermière

/

Bakterio laktikoen hazkunde dinamika esne gordinarekin egindako Ossau-Iraty J.I.B gaztan: *Lactococcus lactis* basati anduien erabiltzea baserritako fabrikazioan

Memoria para optar al grado de Doctor, presentada por la Licenciada:

Fabienne Feutry

Directora de Tesis:

Dra Paloma Torre Hernández

Pamplona/Iruña, 2016

Miembros del tribunal

AUTORIZACION DEL DIRECTOR DE TESIS

***"Il reste toujours assez de force à
chacun pour accomplir ce dont il est convaincu"*** De Johann Wolfgang
von Goethe

Remerciements / Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra Paloma Torre, por darme la oportunidad de acogerme en la Universidad Pública de Navarra, introducirme en el mundo de la investigación y de ir avanzando y madurando en el mismo.

Je voudrais remercier tous les co-auteurs extra-UPNA des articles scientifiques qui composent cette thèse, Nathalie Desmasures, Erik Casalta, Francisco Pérez Elertondo pour leur participation et plus particulièrement, Françoise Berthier pour son implication, pour m'avoir apporté son soutien sans faille et ses précieux conseils tout au long de ce projet.

Mis agradecimientos también van a mis compañeros de la Universidad Pública de Navarra, compañeras sobre todo ya que fue un mundo bastante femenino durante el tiempo en el que estuve en el laboratorio: María Oneca, María Ortigosa, Aurora Irigoyen, Maite Urdin, Maite Castiella, Carlos Mendiola por su cálida acogida y muy especialmente a Inés Arana y Susana García por haberme también acompañado en las fases técnicas de la tesis.

A tous les producteurs qui ont été sollicités pour obtenir des échantillons de laits, de fromages, de lactosérums, à ceux qui ont permis la réalisation des essais de fabrication et aux techniciens fromagers qui les ont accompagnés, merci, milesker.

A Pamplona, tengo que dar las gracias ya que me ha permitido enriquecerme de su cultura, de su modo de vivir y de sus múltiples oportunidades para aprender y conocer a la gente.

Ce mémoire de thèse intitulé «Dynamique des bactéries lactiques dans le fromage AOP au lait cru : utilisation de souches sauvages de *Lc. lactis* en fabrication fermière» est présenté selon la norme régissant les doctorats réalisés à l'Université Publique de Navarre (Acuerdo A-3/2015 de 11 de febrero de 2015 de EDONA) qui permet de présenter une thèse sous la forme d'une compilation de publications scientifiques.

Le travail de recherche mené dans cette thèse doctorale a ainsi donné lieu à trois articles scientifiques publiés entre 2012 et 2016. Ils constituent le corps de la thèse et sont représentatifs du travail expérimental accompli et des résultats scientifiques apportés. Ces trois publications sont les suivantes :

1 - Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F., Torre, P., (2012). Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology*: 29, 33-42. DOI: 10.1016/j.fm.2011.08.011

2 - Feutry, F., Torre, P., Arana, I., García S., Desmasures, N., Casalta, E., (2012). *Lactococcus lactis* strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity. *Dairy Science and Technology*: 92, 655-670. DOI: 10.1007/s13594-012-0084-3

3 -Feutry, F., Torre, P., Arana, I., García S., Pérez Elortondo. F., Berthier, F., (2016) Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses. *Food Microbiology*: 56, 52-68. DOI: 10.1016/j.fm.2015.12.004

Chaque article scientifique constitue un **chapitre du mémoire (chapitres 2 à 4)**. Chacun de ces chapitres contient son propre résumé, une introduction spécifique, la description du matériel et des méthodes utilisés, les résultats obtenus, la discussion de ces résultats et les références bibliographiques qui s'y rapportent. L'indice d'impact de la revue hébergeant la publication et la contribution du doctorant au travail correspondant ainsi qu'un résumé en français, en espagnol et en basque précèdent chacun des articles scientifiques. Même s'ils constituent une unité thématique, ces chapitres peuvent néanmoins être lus de manière indépendante grâce à l'introduction des éléments de compréhension du sujet traité dans chacun d'entre eux.

En plus de ces chapitres 2 à 4, ce mémoire inclut (i) un **glossaire** afin que certains termes utilisés fréquemment dans le texte soit compris de façon identique par les lecteurs, (ii) une **liste d'abréviations** utilisées dans le chapitre 1, (iii) un **résumé global** en espagnol, français, anglais et basque, (iv) une **introduction générale** qui présente les travaux publiés et leur unité thématique, (v) **un premier chapitre comprenant** une introduction qui couvre les principales thématiques traitées dans le travail présenté, les objectifs fixés et la méthodologie utilisée, (vi) **un dernier chapitre** (chapitre 5) avec les conclusions générales obtenues durant ce travail et les perspectives d'investigations envisagées. Les **références bibliographiques** des chapitres 1 et 5 sont fournies dans une section unique située à la fin du manuscrit.

Le thème général du travail effectué lors de cette thèse est la biodiversité microbienne des fromages de brebis fabriqués à partir de lait cru. En effet, par son apport en communautés microbiennes diverses, le lait cru participe de façon bénéfique au développement des caractéristiques sensorielles du fromage. L'augmentation de la biodiversité microbienne de ces fromages pourrait alors passer par l'ajout de souches dites sauvages, isolées du lait cru, caractérisées et adaptées à la technologie fromagère étudiée. Plus spécifiquement, ce travail traite de la possibilité d'utiliser, en fabrication, des souches sauvages de bactéries lactiques isolées de lait cru produit sur la zone de production de l'Ossau-Iraty afin de proposer une alternative à l'utilisation du levain commercial acidifiant communément utilisé par les fromagers fermiers.

Cette démarche suppose de connaître au préalable les bactéries lactiques présentes dans le fromage tel qu'il est produit aujourd'hui et l'évolution de leur nombre au cours de la fabrication et de l'affinage. Cette connaissance permet, d'une part, de cibler des groupes ou espèces de bactéries lactiques participant à l'élaboration du fromage et de choisir ceux ou celles qui seraient utilisables pour formuler de nouveaux levains acidifiants, et d'autre part, d'identifier des interactions entre espèces et/ou genres bactériens de bactéries lactiques au cours de la transformation fromagère.

L'article publié dans Food Microbiology, présenté dans le chapitre 2 et intitulé «**Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters**», constitue la première étape de cette démarche. Il permet de faire un premier état des lieux de la diversité taxonomique des bactéries lactiques, à la fois au sein de chacun des fromages analysés et au sein d'un ensemble de fromages fermiers Ossau-Iraty ; ces fromages ont été fabriqués avec du lait cru et différents types de levains communément utilisés par les fromagers fermiers. Il permet aussi de décrire précisément la biodiversité et les dynamiques de croissance des bactéries lactiques en fromage à différents niveaux taxonomiques allant du genre à la souche. Ce travail a montré que ce sont des souches de l'espèce de bactéries lactiques *Lactococcus lactis* qui doivent être incorporées à de nouveaux levains acidifiants. La suite du travail s'est donc focalisée sur les souches de cette espèce de bactéries lactiques.

L'article publié dans Dairy Science and Technology, présenté dans le chapitre 3 et intitulé «***Lactococcus lactis* strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity**», présente un état des lieux des niveaux de *Lactococcus lactis* rencontrés dans des laits de brebis recueillis dans trois zones géographiques de l'aire de production de l'Ossau-Iraty. La diversité intra-espèce a été évaluée au niveau technologique et génotypique à partir d'isolats issus de ces laits afin de sélectionner des souches potentiellement

utilisables dans la formulation d'un levain acidifiant à souches multiples. L'analyse des profils génotypiques a été facilitée par la constitution d'une base de données de profils génotypiques de bactéries lactiques lors du travail mené et présenté dans la publication précédente (cf. chapitre 2). Sur la base des informations à la fois génotypiques mais aussi technologiques recueillies, 6 souches ont été sélectionnées.

La possibilité d'utiliser des souches sauvages sélectionnées passe obligatoirement par une phase de validation en fromage et à une évaluation de plusieurs critères notamment des critères d'hygiène et des critères sensoriels. L'article publié dans Food Microbiology, présenté dans le chapitre 4 et intitulé «**Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses**», traite de l'utilisation d'un mélange de souches sauvages de *Lc. lactis* pour l'élaboration de fromages Ossau-Iraty dans des conditions non standardisées, à l'échelle d'ateliers fermiers. A travers l'évaluation de paramètres physicochimiques, microbiologiques et sensoriels, l'objectif était d'évaluer si, au cours de leur fabrication et de leur affinage, ce levain répondait aux attentes des professionnels de l'Ossau-Iraty de manière au moins équivalente à celle du levain commercial usuel en termes de capacité d'acidification et de caractéristiques sensorielles et sanitaires des fromages.

Glossaire / Glosario	1
Liste des abréviations / Listado de abreviaturas	2
General Abstract	3
Résumé Général	5
Resumen general	8
Laburpen orokorra	11
 <u>Chapitre 1 / Capitulo 1</u>	 14
Introduction/Introducción	15
Objectifs / Objetivos	58
Méthodologie / Metodología	60
 <u>Chapitre 2 / Capitulo 2</u>	 64
Indice d'impact & Contributions / Indice de impacto & Contribuciones	65
Résumé	66
Resumen	67
Laburpena	68
Article 1 /Artículo 1 : <i>Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters (10 pages/páginas).</i>	
 <u>Chapitre 3 / Capitulo 3</u>	 79
Indice d'impact & Contributions / Indice de impacto & Contribuciones	80
Résumé	81
Resumen	82
Laburpena	83
Article 2 /Artículo 2 : <i>Lactococcus lactis strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity (16 pages/páginas)</i>	

<u>Chapitre 4 / Capitulo 4</u>	100
Indice d'impact & Contributions / Índice de impacto & Contribuciones	101
Résumé	102
Resumen	103
Laburpena	104
 Article 3 / Artículo 3 : Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses (17 pages/páginas)	
 <u>Chapitre 5 / Capitulo 5</u>	 122
Conclusions / Conclusiones	123
Perspectives / Perspectivas	126
 Références bibliographiques / Referencias bibliográficas	 130

Il est apparu nécessaire de joindre la définition d'un certain nombre de termes employés tout au long de ce manuscrit pour qualifier les souches afin que les lecteurs leur attribuent un sens commun et partagé. Les définitions sont issues du centre national de ressources textuelles et lexicales du CNRS (<http://www.cnrtl.fr/lexicographie/>). Elles ont été adaptées aux souches et au domaine fromager.

- Les termes en lien avec l'origine géographique de la source matricielle à partir de laquelle les souches ont été isolées :

- **Autochtone = Indigène** : qui est originaire du pays où il vit. Par extension, une souche autochtone ou indigène est isolée d'une matrice prélevée sur un lieu identifié donné. Dans le cas de travaux effectués sur des AOP fromagères, l'autochtonie se rapporte à l'aire géographique délimitée pour la production du fromage concerné.

- **Exogène** : par opposition à autochtone ou indigène, qui provient de l'extérieur, qui a sa source hors du système. Par extension, une souche exogène est isolée d'une matrice ne se situant pas sur l'aire géographique où elle va être introduite. Les souches commerciales utilisées pour l'ensemencement des laits en vue de la transformation fromagère sont qualifiées d'exogènes.

- Les termes en lien avec la préservation des potentialités métaboliques des souches sélectionnées :

Sauvage : conforme à l'état de nature, qui n'a pas subi l'action de l'Homme. Par extension, désigne les souches qui ont été fraîchement isolées de leur source matricielle et qui n'ont pas subi de nombreux repiquages successifs, qui selon les conditions, peuvent modifier leurs capacités métaboliques d'origine.

Domestiqué : antagonisme de sauvage. Par extension, les souches sélectionnées ayant subi des repiquages successifs dans des conditions de culture modifiées par rapport à leur matrice d'origine et développant des capacités métaboliques adaptées à ces nouvelles conditions sont considérées comme des souches domestiquées.

ALFP : Amplified Fragment-Length Polymorphism ou Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AOP : Appellation d'Origine Protégée

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

BCV : Branched Chain Volatile Coumpound ou Composés volatils à chaîne ramifiée

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou électrophorèse en gradient de gel dénaturant

DOP : Denominación de Origen Protegida

EPS : Exopolysaccharide

GRAS : Generally Recognized as Safe ou Généralement reconnu comme inoffensif

JIB : Jatorrizko Izendapen Babestua

LAB : Lactic Acid Bacteria ou bactéries lactiques

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

MLSA : Multilocus sequence analysis ou Analyse séquentielle multilocus

MLST : Multilocus sequence typing ou Typage séquentiel multilocus

NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria ou bactéries lactiques à vocation non acidifiante

Pc : *Pediococcus*

PCR : Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis ou Electrophorèse en champ pulsé

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA ou Amplification ou Amplification aléatoire d'ADN polymorphe.

REA : Restriction Enzymatic Analysis ou Analyse par restriction enzymatique

RFLP : Restriction Fragment Lenght Polymorphism. ou Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium

SLAB : Starter Lactic Acid Bacteria ou bactéries lactiques à vocation acidifiante

St : *Streptococcus*

Ossau-Iraty cheese is the only ripened, uncooked and pressed French PDO ewe's milk cheeses. The traditional cheese-making using raw milk mainly comes from the farmhouses or small dairies located in the Ossau-Iraty cheese area. Even manufacturing with raw milk, cheese-makers need the use of commercial starters to ensure homogeneous and regular cheese production because of insufficient levels of lactic acid bacteria. The commercial starters commonly used are mainly composed of *Lactococcus lactis* strains. As showed in some studies, the raw milk microbiota and the use of starters are essential components in building the characteristics of ewe's milk cheeses with similar technology respect to Ossau-Iraty cheese. Moreover, the genotypic diversity and the technological potential of wild *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) strains recently isolated from ewe's milk have been investigated and proved in comparison with commercial strains. The link between the wild strain genotypes and their geografical origin has been showed in some cases. The preservation of the microbial diversity is essential for preserving the sensory characteristics of traditional cheeses. Since this work, the microbiota of Ossau-Iraty cheese has never been explored.

As a component of the microbiota of Ossau-Iraty cheese, this thesis studied the Lactic Acid Bacteria (LAB) microbiota with these specific objectives:

- (i) - to describe the taxonomic biodiversity and the growth dynamics of LAB, from genus to strain levels, within and among 6 farm-house Ossau-Iraty cheeses according to five cheesemakers' practices representative of those used in the PDO area.
- (ii) - to assess the levels of *Lc. lactis* in ewe's milk produced in the Ossau-Iraty PDO cheese sub-areas and to investigate the genotypic and technological diversity of isolated wild *Lc. lactis* strains for their potential use in multi-strain starter formulations.
- (iii) - to evaluate whether a new mixed-strain starter composed of selected wild *Lc. lactis* strains achieves the desirable characteristics for mature Ossau-Iraty raw milk cheeses manufacturing at farm-houses under the usual conditions prevailing there, at least as well as the commercial starter currently used.

The first objective was achieved by exploring the biodiversity and the growth dynamics of LAB of farm-house cheeses from vat milk to 180 days of ripening. Cheeses manufacture was made from six independent batches made from six raw ewe's milks, using five typical cheese-making methods. Commercial starter S1 was used for three batches, starter S1 combined with S2 for one batch and no starter for two batches. Up to ten LAB species from five genera and up to two strains per species were identified per milk; up to eleven species from five genera and up to three strains per species were identified per cheese. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, and *Leuconostoc mesenteroides* were detected in all cheeses. Lactococci reached the highest counts irrespective of the milk and starter used. *Lactococcus*

Lactis and *Enterococcus* spp. increased during manufacture, and mesophilic lactobacilli increased during ripening. Strain and species numbers, the percentage of isolates originating from the raw milk, maximum counts of each genus/species and time for reaching them, all varied according to whether or not a starter was used and the composition of the starter. The genotypes of strains within species varied according to the raw milk used. This generated distinct LAB microbiota throughout manufacture and ripening that will certainly impact on the characteristics of the ripened cheeses.

The second objective was achieved by the assesment of the levels of *Lc. lactis* from ewe's milks produced in ewe's milk produced in three Ossau-Iraty cheese sub-areas and the study of the genotypic and technological diversity of isolated wild strains. Thirty-two milk samples from 32 farms were collected. Strains of *Lc. lactis* were identified and quantified using a combination of species and subspecies-specific polymerase chain reaction (PCR) and PCR amplification of repetitive bacterial DNA elements (Rep-PCR). The genotypic and technological diversity of the indigenous strains was compared to that of 12 commercial strains. *Lc. lactis* was detected in milk samples from only 20 farms. The levels detected were below 4 log₁₀ cfu.mL⁻¹ in 75% of the milks. *Lc. lactis* subsp. *lactis* dominated in 66% of the samples. Forty-three genotypic profiles of wild *Lc. lactis* strains were detected and showed greater diversity than those of the commercial strains. Milks containing *Lc. lactis* contained one to four distinct strains. With the exception of two strains, each strain was found in milk from only one farm. The Prt⁺ strains were the most acidifying. Sensitivity to phages collected from wheys differed widely between the commercial (60%) and indigenous strains (5%). Wild strains of *Lc. lactis* displayed a wide genotypic and technological diversity. Genotypic diversity seemed to be linked to the farm of origin. Six strains have been selected.

The third objective was achieved by the comparison of 12 Ossau-Iraty raw milk cheeses from 3 farmhouses, manufactured under the conditions prevailing at each farm, either with the new starter (OI) combining 6 raw milk strains of *Lc. lactis*, recently isolated and characterized, either with the current starter S1. Compliance of the sensory characteristics with those expected by the Ossau-Iraty professionals, physicochemical parameters and coliforms were quantified at key manufacturing steps. The new starter OI gave cheeses having proper compliance but having lower compliance than the S1 cheeses under most manufacturing conditions, while managing coliform levels equally well as starter S1. This lower compliance relied more on the absence of *Streptococcus thermophilus* in starter OI, than on the nature of the lactococcal strains present in starter OI. The study also shows that variations in 5 technological parameters during the first day of manufacture, within the range of values applied in the 3 farmhouses, are powerful tools for diversifying the scores for the sensory characteristics investigated.

L'Ossau-Iraty est le seul fromage de brebis français à pâte pressée non cuite bénéficiant d'une AOP. Sa fabrication traditionnelle au lait cru, majoritairement représentée par la production fermière, requiert aujourd'hui l'utilisation de levains acidifiants d'origine commerciale qui permettent une production homogène et régulière de fromages car les niveaux en bactéries lactiques des laits crus sont insuffisants. Les levains acidifiants actuellement utilisés sont majoritairement composés de souches de *Lactococcus lactis*. L'influence de la présence de populations microbiennes originaires du lait cru et de l'utilisation de levains acidifiants composés de souches sauvages a été montrée sur les caractéristiques de fromages de brebis de technologie similaire à l'Ossau-Iraty. De plus, la diversité génotypique et le potentiel technologique des souches sauvages de *Lc. lactis* fraîchement isolées de lait de brebis ont été explorées et prouvées comparativement à des souches commerciales. Le lien entre les génotypes des souches sauvages et leur origine géographique a pu être fait dans certains cas. La préservation de la biodiversité microbienne est un enjeu pour la préservation des caractéristiques sensorielles des fromages traditionnels. Le microbiote de l'Ossau-Iraty n'a jamais été étudié jusqu'à présent.

Ce travail de thèse s'est intéressé à la composante «bactéries lactiques»(LAB) du microbiote Ossau-Iraty avec les objectifs spécifiques suivants :

- (i) décrire la biodiversité taxonomique et les dynamiques de croissance des bactéries lactiques, du genre à la souche, dans 6 fromages Ossau-Iraty fermiers élaborés avec du lait cru selon trois pratiques d'ensemencement de levains usuellement utilisés sur l'aire de production,
- (ii) évaluer les niveaux de *Lc. lactis* dans le lait cru produit sur l'aire géographique de l'Ossau-Iraty et explorer la diversité génotypique et le potentiel technologique de souches sauvages afin d'envisager leur utilisation dans la formulation d'un levain,
- (iii) évaluer si l'utilisation d'un levain composé de souches de *Lc. lactis* sauvages sélectionnées conduit à des caractéristiques comparables à celles de fromages Ossau-Iraty au lait cru fabriqués avec le levain acidifiant commercial usuel, dans des conditions de fabrication non standardisées de trois fermes de l'aire de production.

L'exploration de la biodiversité et des dynamiques de croissance des LAB du lait de cuve mis en œuvre jusqu'au fromage affiné 180 jours de fromages fermiers Ossau-Iraty a permis de répondre au premier objectif. Six fabrications distinctes au lait cru ont été réalisées dans cinq fermes utilisant des méthodes fromagères traditionnelles. Le starter S1 a été utilisé pour trois fabrications, le starter S1 combiné au S2 pour une fabrication et aucun starter n'a été rajouté pour deux fabrications. Jusqu'à dix espèces de LAB appartenant à cinq genres et jusqu'à 2 souches par espèce ont été identifiées par lait ; jusqu'à 11 espèces appartenant à 5 genres et jusqu'à trois souches par espèces ont été identifiées par fromage. Cinq espèces, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* et *Leuconostoc mesenteroides*, ont été

détectées dans tous les fromages. *Lactococcus lactis* atteignait les niveaux les plus élevés quel que soit le lait mis en fabrication et le levain utilisé. *Lactococcus lactis* et *Enterococcus* spp. augmentaient durant la fabrication et les lactobacilles mésophiles augmentaient durant l'affinage. Le nombre de souches et d'espèces, le pourcentage des isolats provenant du lait cru, les dénombrements maximum de chaque genre/espèce et le moment où ils sont atteints, variaient selon l'utilisation ou non de levain mais aussi selon la composition en espèces du levain utilisé. Les génotypes des souches de même espèce variaient selon le lait cru mis en fabrication. Des communautés distinctes de bactéries lactiques étaient donc présentes durant la fabrication et l'affinage.

L'évaluation des niveaux de *Lc. lactis* de laits de brebis produits dans trois régions internes de l'aire de production du fromage Ossau-Iraty et l'étude de la diversité génotypique et technologique des souches sauvages isolées de ces laits a permis de répondre au second objectif. Trente deux échantillons de lait provenant de 32 fermes ont été collectés. Les souches de *Lc. lactis* ont été identifiées et quantifiées en combinant l'utilisation de PCR spécifique d'espèce et de sous-espèce avec celle de la Rep-PCR. La diversité génotypique et technologique des 180 souches sauvages isolées a été comparée à celle de 12 souches commerciales. *Lc. lactis* a été détecté dans les échantillons de lait de seulement 20 fermes. Les niveaux détectés étaient inférieurs à $4 \log_{10}$ cfu mL⁻¹ dans 75% des laits. *Lc. lactis* subsp. *lactis* dominaient dans 66% des laits. Quarante-trois profils génotypiques différents ont été mis en évidence chez les souches sauvages qui montraient une plus grande diversité que celle des souches commerciales. Les laits contenant *Lc. lactis* contenaient de une à quatre souches distinctes. A l'exception de deux souches, chaque souche n'était retrouvée que dans le lait d'une seule ferme. Les souches ayant une protéase de paroi (Prt⁺) étaient les plus acidifiantes. La sensibilité aux phages collectés à partir de lactosérums différaient largement entre les souches commerciales (60%) et sauvages (5%). Les souches sauvages de *Lc. lactis* ont montré une grande diversité génotypique et technologique. La diversité génotypique semblait être liée à la ferme d'origine. Six souches ont été sélectionnées.

La comparaison de 12 fromages fabriqués dans trois fermes dans les conditions propres à chacune, avec soit un nouveau levain acidifiant (OI) combinant les 6 souches sauvages de *Lc. lactis* préalablement sélectionnées, soit le levain commercial usuel, composé de streptocoques et de lactocoques (S1), a permis de répondre au troisième objectif. La conformité des caractéristiques sensorielles avec celles attendues par les professionnels de l'Ossau-Iraty ainsi que les paramètres physicochimiques et les coliformes ont été quantifiés à des étapes clés de la fabrication. Le nouveau starter OI a donné des fromages ayant une conformité sensorielle correcte mais moindre qu'avec les fromages S1 dans la plupart des conditions de fabrication tandis que les niveaux de coliformes étaient équivalents dans les fromages avec l'un et l'autre des levains. Cette moindre conformité sensorielle dépendait davantage de l'absence de *Streptococcus thermophilus* dans le levain OI que de

la nature des souches de *Lc. lactis* présentes dans le levain OI. Cette étude montre aussi que les variations de 5 paramètres technologiques durant le premier jour de fabrication, dans la limite des valeurs appliquées dans les 3 fermes, sont des outils puissants pour diversifier les notes des caractéristiques sensorielles étudiées.

El queso Ossau-Iraty es el único queso francés de oveja de pasta prensada no cocida acogido a una DOP (Denominación de Origen Protegida). La elaboración tradicional con leche cruda, es representada mayoritariamente por la producción quesera de los pastores. Dicha fabricación, necesita hoy en día, el uso de cultivos iniciadores comerciales que permiten una producción homogénea y regular de quesos ya que generalmente los niveles de bacterias lácticas de las leches crudas son insuficientes. Los cultivos iniciadores comerciales están compuestos principalmente por cepas de *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*). En quesos de oveja fabricados de manera similar al queso Ossau-Iraty, se ha demostrado previamente la influencia de la presencia de poblaciones microbianas procedentes de la leche cruda así como el uso de cultivos iniciadores compuestos de cepas autóctonas sobre las características de los mismos. Además, se ha investigado comparativamente la diversidad genotípica y el potencial tecnológico de las cepas autóctonas de *Lc. lactis* aisladas de leche de oveja frente a cepas comerciales. El genotipo de las cepas salvajes ha sido vinculado con el origen geográfico en algunos casos. La preservación de la biodiversidad microbiana es fundamental para mantener las características sensoriales de los quesos tradicionales. La microbiota del queso Ossau-Iraty nunca había sido estudiada hasta ahora.

El objetivo principal de este trabajo de tesis ha sido el estudio de las bacterias lácticas (LAB) que forman parte de la microbiota del queso Ossau-Iraty con los objetivos específicos siguientes:

- (i) describir la biodiversidad taxonómica y la dinámica de crecimiento de las bacterias lácticas, del género a la cepa, en 6 quesos elaborados en 5 granjas con leche cruda y según 3 modos de siembra con cultivos iniciadores comúnmente utilizados en el área de producción,
- (ii) evaluar los niveles de *Lc. lactis* en la leche cruda producida en el área del queso Ossau-Iraty e investigar la diversidad genotípica y el potencial tecnológico de cepas salvajes para diseñar un posible cultivo iniciador,
- (iii) evaluar si con el uso de un cultivo iniciador compuesto por cepas seleccionadas de *Lc. lactis* autóctonos, se producen quesos de características comparables a las de los quesos Ossau-Iraty elaborados con leche cruda y el cultivo iniciador comercial usual, en condiciones de fabricación no estandarizadas de 3 granjas situadas en el área de producción.

Para responder al primer objetivo se ha investigado sobre la biodiversidad y la dinámica del crecimiento de las bacterias lácticas (LAB) aisladas de quesos artesanales Ossau-Iraty elaborados en cinco granjas productoras de su propio queso, desde la leche de cuba hasta el queso de 180 días de maduración. Se realizaron seis fabricaciones distintas con leche cruda procedente de cinco granjas cada una de las cuales utilizó sus métodos habituales de elaboración. Se utilizó el cultivo iniciador S1 en tres fabricaciones, el S1 combinado con el S2 en otra y en las dos fabricaciones restantes no se añadió cultivo iniciador. En cada leche, se identificaron hasta 10 especies de LAB pertenecientes a 5

géneros y hasta 2 cepas por especie. En cada queso, se identificaron hasta 11 especies de LAB pertenecientes a cinco géneros y hasta tres cepas por especie. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Leuconostoc mesenteroides* fueron aislados en todos los quesos. Los lactococos alcanzaron niveles más altos independientemente de su nivel en la leche inicial y del cultivo iniciador utilizado. *Lactococcus lactis* y *Enterococcus* spp. aumentaron durante la fabricación y los lactobacilos mesófilos durante la maduración. El número de cepas y de especies, el porcentaje de cepas aisladas procedentes de la leche cruda, los recuentos máximos de cada género/especie y el momento en el que se alcanzaron, variaron según la composición del cultivo iniciador utilizado. Los genotipos de las cepas de la misma especie variaron según la leche cruda utilizada. Por todo ello, se comprueba la presencia de diferentes comunidades de LAB durante la fabricación y la maduración, lo que influirá sobre las características de los quesos maduros.

En relación al segundo objetivo se realizó la cuantificación de los niveles de *Lc. lactis* presentes en la leche de oveja producida en tres áreas internas de la zona de producción del queso Ossau-Iraty y la evaluación de la diversidad genotípica y tecnológica de cepas de *Lc. lactis* aisladas de estas mismas leches. Se recogieron treinta y dos muestras de leche. Las cepas de *Lc. lactis* fueron identificadas y cuantificadas gracias al uso combinado de la PCR específica de especie y de sub-especie con la Rep-PCR. Se comparó la diversidad genotípica y tecnológica de las cepas salvajes con la de 12 cepas comerciales. *Lc. lactis* fue detectada en muestras de leche de únicamente 20 granjas. Los niveles detectados fueron por debajo de $4 \log_{10} \text{ cfu mL}^{-1}$ en 75% de las leches. *Lc. lactis* subsp. *lactis* fue dominante en 66% de las muestras. Se identificaron 43 perfiles genotípicos de cepas autóctonas de *Lc. lactis* que mostraron una mayor diversidad que los de las cepas comerciales. Las leches que contuvieron *Lc. lactis* presentaron de una a cuatro cepas distintas. Excepto para dos cepas, cada cepa fue aislada de la leche de una sola granja. Las cepas Prt⁺ fueron las más acidificantes. La sensibilidad de las cepas salvajes a los fagos colectados a partir de lactosueros se diferenció mucho entre las cepas comerciales (60%) y salvajes (5%). Las cepas salvajes de *Lc. lactis* han mostrado una gran diversidad genotípica y tecnológica. La diversidad genotípica apareció ligada a la granja de la cual procedía cada cepa. Este estudio suscita nuevas cuestiones relativas a los factores que podrían influenciar sobre tal biodiversidad. Un mayor conocimiento de las propiedades tecnológicas dependientes de cepa será muy útil para la selección de cepas a utilizar en la preparación de nuevos cultivos iniciadores.

Finalmente, en relación al tercer objetivo, se analizaron 12 quesos elaborados en 3 granjas diferentes y respetando las condiciones de fabricación propias de cada una, o con un nuevo cultivo iniciador (OI) que combina 6 cepas salvajes caracterizadas de *Lc. lactis* recientemente aisladas de leche cruda,

o con el cultivo iniciador comercial comúnmente utilizado, compuesto por estreptococos y lactococos (S1). Se compararon en las etapas claves de la elaboración: los parámetros físico químicos, los niveles de coliformes y la conformidad de las características sensoriales obtenidas con las esperadas por los profesionales del Ossau-Iraty. La conformidad sensorial obtenida con el nuevo fermento OI fue correcta pero menor que la obtenida por los quesos S1 en la mayoría de la condiciones de fabricación mientras que los niveles de coliformes fueron similares con cualquiera de los dos fermentos. Esta menor conformidad sensorial dependió más de la ausencia de *Streptococcus thermophilus* dentro del fermento OI que de las cepas de lactococos presentes dentro del fermento OI. Este estudio indicó también que las variaciones de 5 parámetros tecnológicos durante el primer día de elaboración, en el límite de los valores aplicados en cada granja, son herramientas poderosas para diversificar las notas de las características sensoriales.

Ossau-Iraty gazta egosi ez den pasta prentsatuarekin egiten den eta JIB bati (Jatorrizko Izendapen Babestua) atxikiriko Frantziako ardi gazta bakarra da. Tradizioz esne gordinaz egiten da, eta artzainek egiten dute gazta-ekoizpen gehiena. Fabrikazio hori egin ahal izateko, gaur egun, beharrezkoa izaten da kultibo hasle komertzialak erabiltzea, gaztaren ekoizpen homogeneoa eta erregularra lortzeko, zeren esne gordinek eduki ohi duten bakterio laktikoen mailak ez baitira aski izaten. Batez ere *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) bakterioen anduek osatzen dituzte kultibo hasleak. Ossau-Iraty gaztaren antzera egiten diren ardi gaztetan aldeztatik demostratu da gazta horien ezaugarrietan eragina dutela esne gordinean dauden mikrobio populazioek, baita andui autoktonoek osatutako kultibo hasleak erabiltzeak ere. Gainera, ardi esnetik isolatu diren *Lc. lactis* bakterioaren zepa basatien aniztasun genotipikoa eta potentzial teknologikoa eta andui komertzialena konparatiboki aztertu dira. Andui autoktonoen genotipoa, zenbait kasutan, jatorri geografikoarekin lotu da, eta bioaniztasun mikrobianoari eustea behar-beharrezkoa da gazta tradizionalen ezaugarri sentsozialei eusteko. Ossau-Iraty gaztaren mikrobiota aztertzen den lehen aldia da.

Tesi-lan honen helburu nagusia izan da Ossau-Iraty gaztaren mikrobiota osatzen duten bakterio laktikoak (LAB) aztertzea, helburu zehatz hauekin:

- (i) Bakterioen dibertsitate biologiko taxonomikoa eta bakterio laktikoen (LAB) hazkundearen dinamika deskribatzea, generotik anduira, 5 baserritan esne gordinarekin egindako 6 gaztatan, ekoizpen eremu honetan erabili ohi diren kultibo hasleekin egindako 3 eremumoduren arabera,
- (ii) Ossau-Iraty gaztaren eskualdean ekoizten den esne gordineko *Lc. lactis* bakterioaren mailak ebaluatzea, eta andui basatien aniztasun genotipikoa eta potentzial teknologikoa ikertzea, kultibo hasle bat diseinatzeko ahal ote den ikusteko.
- (iii) *Lc. lactis* bakterio autoktonoen andui aukeratuekin egindako kultibo hasle bat erabiliz gero, esne gordinarekin eta ohiko kultibo hasle komertzialarekin egiten diren bezalako Ossau-Iraty gaztak egiten ote diren ebaluatzea, ekoizpen eremuan dauden 3 baserritako fabrikazio baldintzak ez estandarizatueta.

Lehen helburuari erantzuteko, Ossau-Iraty artisautza-gaztetatik isolatutako bakterio laktikoen biodibertsitatea eta hazkunde-dinamika ikertu dira. Gazta hauek beren gazta egiten duten bost baserritakoak ziren, eta baserriek gazta ekoizten dute kupela-esnetik gazta egin arte, 180 egunetako heldutasun-prozesuaren ondoren. Bost baserritatik zetorren esne gordinarekin sei fabrikazio ezberdin egin ziren, eta baserri bakoitzak bere ohiko moduan egin zituen gaztak. S1 kultibo haslea hiru fabrikaziotan erabili zen, beste batean S1 kultibo haslea S2rekin nahasita, eta gainerako beste bi fabrikazioetan ez zen kultibo haslerik erabili. Esne bakoitzean 10 LAB espezie identifikatu ziren, 5 generotakoak, eta 2 andui gehienez, espezieko. Gazta bakoitzean 11 LAB espezie identifikatu ziren, 5

generotakoak, eta 3 andui gehienez, espezieko. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* eta *Leuconostoc mesenteroides* gazta guztietan isolatu ziren. *Lc. lactis*-ek maila handiagoak harrapatu zituen, alde batera utzita hasierako esnean zeukaten kontzentrazioa eta erabilitako kultibo haslea. *Lc. lactis* eta *Enterococcus spp.* kopurua handiagotu egin zen fabrikazioan zehar, eta laktobazilo mesofiloena heltze-prozesuan. Anduien eta espezieen kopurua, esne gordinetan isolatu ziren anduien ehunekoa, genero/espezie bakoitzaren zenbaketa maximoa eta hori noiz harrapatu zen, horiek denak erabilitako kultibo haslearen konposizioaren arabera aldatu ziren. Espezie bereko anduien genotipoak erabilitako esne gordinaren arabera aldatu ziren. Horregatik guztiatik, egiaztatu egin da fabrikazioan eta heltze-prozesuan hainbat LAB komunitate dagoela, eta horrek gazta helduen ezaugarrietan eragiten du.

Bigarren helburuari dagokionez, Ossau-Iraty gazta ekoizten den eremuko hiru barne-aldeetan ekoizten den ardi-esnean dauden *Lc. lactis* mailak zenbatu zen eta esne hauetatik isolatu ziren *Lc. lactis-en* andui isolatuen aniztasun genotipikoa eta teknologikoa ebaluatu zen. Hogeita hamabi esne lagin bildu ziren. *Lc. lactis-en* anduiak identifikatu eta zenbatu ziren espeziearen PCR espezifikoaren eta subespeziearen Rep-PCR delakoaren erabilera konbinatuari esker. Heun ta larogoi andui basatien aniztasun genotipiko eta teknologikoa alderatu zen 12 andui komertzialen aniztasunarekin. *Lc. lactis* atzeman zen 20 baserritako esne-laginetan, bakarrik. Esneen % 75 etan atzeman zen maila $4 \log_{10}$ cfu mL⁻¹ baino txikiagoa izan zen. *Lc. lactis* subsp. *lactis* subespeziea, nagusi izan zen laginen % 66tan. Andui komertzialek baino aniztasun handiagoa zeukaten *Lc. lactis-en* andui autoktonoen 43 profil genotipiko identifikatu ziren. *Lc. lactis* eduki zuten esneek andui bat eta lau andui ezberdinen artean eduki zituzten. Bi anduitarako izan ezik, andui bakoitza baserri bakar baten esnetik isolatu zen. Prt + anduiak izan ziren azidotzaileenak. Esne-gazuretatik abiaturik bildu ziren fagoekiko sentiberatasuna oso ezberdina izan zen andui komertzialen (% 60) eta autoktonoen (% 5) artean. *Lc. lactis-en* andui basatien aniztasun genotipiko eta teknologiko handia erakutsi dute. Aniztasun genotipikoa andui bakoitzaren jatorria zen baserriari lotuta ageri zen. Sei andui aukeratu izan dira.

Azkenik, hirugarren helburuari dagokionez, 12 gazta egin ziren 3 baserritan, egin zirenak bakoitzaren ohiko fabrikazio baldintzak errespetatuz, edo esne gordinetik isolatu berri diren laktokokoek osatutako 6 andui basati nahasten dituen kultibo hasle batekin (OI), edo erabili ohi den estreptokokoek eta laktokokoek osatutako kultibo hasle komertzialarekin (S1). Honako hauek alderatu ziren prestaketaren aldi garrantzizkoenetan: parametro fisiko-kimikoak, koliformeen mailak eta lortu ziren ezaugarri sentesorialak profesionalek Ossau-Iratyko gazta batetik espero dezaketenekin bat zetozen edo ez. OI hartigarri berriarekin lortu zen adostasun sentesoriala ona izan zen, baina S1 hartigarriarekin egindako gaztek lortu zutena baino txikiagoa fabrikazio-baldintza gehienetan; bitartean, koliformeen mailak antzekoak izan ziren bi hartigarriekin. Adostasun sentesorial txikiago

honek zerikusi gehiago du OI hartzigarriak *Streptococcus thermophilus* ez edukitzearekin, dauzkan laktokokoan anduiak edukitzearekin baino. Azterketa honek erakutsi zuen, halaber, lehen prestakuntza-egunean 5 parametro aldatzea, baserri bakoitzak aplikatzen dituen balioen muga, tresna eraginkorra dela aztertutako ezaugarri sentsozialak dibertsifikatzeko.

CHAPITRE 1 /CAPITULO 1

INTRODUCTION / INTRODUCCIÓN

OBJECTIFS / OBJETIVOS

MÉTHODOLOGIE / METODOLOGÍA

1 - INTRODUCTION / INTRODUCCIÓN

1.Introduction

1.1.L'Ossau-Iraty parmi les fromages de brebis au lait cru

1.1.1. Un des fromages de brebis européens sous AOP

L'Ossau-Iraty est un fromage bénéficiant d'une AOC depuis 1980 et d'une AOP depuis 1996 (<http://www.ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>). Avec le Roquefort, il fait partie des 2 AOP à base de lait entier de brebis recensées parmi les 45 AOP fromagères que compte aujourd'hui la France (Tableau 1). La production de fromages de brebis est essentiellement localisée en Europe, plus particulièrement dans le bassin méditerranéen et résulte le plus souvent de la transmission d'une culture fromagère traditionnelle (Scintu & Piredda, 2007). Actuellement, 182 fromages répartis dans 13 pays européens bénéficient d'une AOP (Tableau 1). Parmi eux, 25 sont exclusivement fabriqués avec du lait entier de brebis et 33 peuvent être fabriqués avec du lait de brebis mélangé à du lait d'autres espèces, essentiellement avec du lait de chèvre et dans une moindre mesure avec du lait de vache. C'est le cas de la majorité des fromages grecs et de l'ensemble des fromages slovènes et polonais produits avec du lait de brebis.

1.1.2. Aire géographique, opérateurs et production

Fromage au lait de brebis, l'Ossau-Iraty est produit dans le bassin méditerranéen comme la plupart des fromages de brebis (Scintu & Piredda, 2007), plus spécifiquement dans les pays Basque et Béarnais au sud-ouest de la France, sur un territoire délimité au sein du département des Pyrénées Atlantiques (Figure 1). Son aire de production, délimitée aujourd'hui au sud du Gave de Pau, constitue le deuxième bassin français de production ovin-lait après l'Aveyron. Son nom vient du pic du Midi d'Ossau qui surplombe la vallée d'Ossau et tout le Béarn, et de la forêt d'Iraty, qui est la plus grande hêtraie d'Europe.

En 2014, la filière Ossau-Iraty comptait 1289 producteurs de lait, 141 producteurs fermiers, 11 entreprises de collecte et de transformation et 13 ateliers d'affinage. Sur les 47 millions de litre de lait produits sous les conditions AOP, un peu plus de 24 millions sont transformés en Ossau-Iraty. Sur les 3770 tonnes d'Ossau-Iraty vendues par les opérateurs laitiers et fermiers en 2013/2014, 18 % ont été fabriquées avec du lait cru. Les opérateurs laitiers contribuent pour 42 % à cette proportion au lait cru tandis que les fermiers y participent pour 58 %. (ODG AOP Ossau-Iraty, 2014).

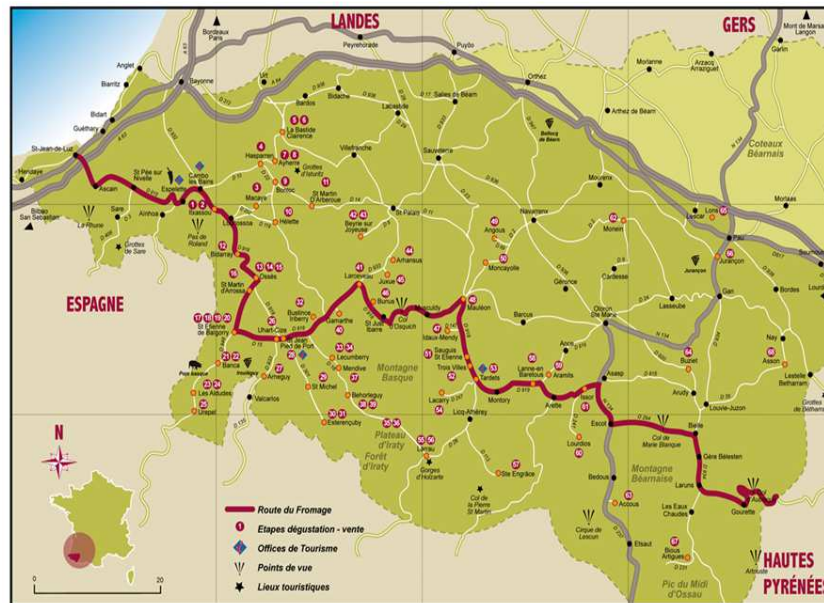


Figure 1. Aire géographique (en vert) de production du fromage Ossau-Iraty. (La ligne rouge représente le tracé de la route du fromage. (ODG Ossau-Iraty, 2014).

1.1.3. Itinéraire technologique et caractéristiques des Ossau-Iraty fermiers

La technologie «Ossau-Iraty» résulte de la transmission d’une culture fromagère traditionnelle comme pour la plupart des fromages traditionnels (Scintu & Piredda, 2007).

L’Ossau-Iraty est fabriqué de Novembre à Août à partir du lait de trois races locales de brebis : la manech tête rousse, la manech tête noire et la basco-béarnaise.

A la ferme, la transformation se fait avec le lait cru de une à quatre traites, en accord avec le cahier des charges. En attendant d’être transformé, le lait est conservé à 4°C. La figure 2 montre le schéma de fabrication. Le caillage est réalisé par ajout de présure animale du commerce (520 mg chymosine/L) à raison de 30 cL maximum pour 100 litres de lait à une température variant entre 28 et 35°C. Durant la montée en température du lait, environ à 25°C, des levains lactiques acidifiants (starter) du commerce sont généralement ajoutés. Ils vont permettre une acidification du lait par transformation du lactose présent en acide lactique. L’expulsion du lactosérum retenu dans le caillé est tout d’abord accentuée par un tranchage mécanique qui va permettre la division du bloc de caillé en grains de taille inférieure à 1 cm³, de manière à accroître les surfaces d’exsudation du sérum. Pour accentuer et accélérer leur contraction, les grains de caillé sont ensuite brassés et chauffés à une température inférieure à 44°C. La vitesse de chauffage recommandée est de 0,5°C/min. Un pré-pressage visant à compacter grossièrement les grains peut avoir lieu en cuve pendant quelques minutes. La masse de caillé est ensuite découpée régulièrement en morceaux de poids identiques ; chaque portion est alors introduite dans un moule de format adéquat tapissé d’une toile ou dans un

moule micro-perforé, où il prendra sa forme définitive. Le caillé subit alors une phase de pressage mécanique entrecoupée par au moins un retournement : un premier pressage d'environ 30 min de 50 g/cm², un deuxième pressage plus accentué de 3 à 4 heures de 150 g/cm². Ces opérations ont pour but d'évacuer les dernières portions de lactosérum subsistant dans la masse de grains. A la fin du pressage, le pH doit avoisiner 5,5. L'égouttage se poursuit en moule pendant environ 15 heures jusqu'à obtenir un pH aux alentours de 5,2. Le caillé est ensuite démoulé et salé. Deux modalités de salage sont utilisées, en plongeant le fromage dans un bac de saumure ou directement avec du gros sel, à raison respectivement de 12 h/kg de fromage ou 24 h/kg. Le fromage existe sous deux formats, un de 4 à 5kg et un autre de 2 à 3 kg. L'affinage se fait durant un minimum de 120 jours pour les grands formats et de 80 jours pour les petits formats à une température pouvant être comprise entre 6 et 15°C et avec une hygrométrie supérieure à 75%. Durant cette période, les fromages sont régulièrement brossés, retournés, en fonction des habitudes du fromager, dans le but de favoriser la formation de la croûte. De forme cylindrique, à talon droit ou légèrement convexe, il a une croûte allant du jaune orangé au gris. Le fromage affiné doit contenir au minimum 50% de gras sur sec et 58% de matière sèche. Au niveau organoleptique, le cahier des charges indique que sa pâte doit être lisse, ferme à onctueuse, de couleur variant du blanc ivoire au crème ambré en fonction de l'affinage. Elle peut présenter quelques ouvertures de petite taille. Sa croûte doit être naturelle, constituée par une flore microbienne vivante. Elle est solidaire de la pâte, non digérée, non délitée, non écaillée. Sa couleur va du jaune orangé au gris. L'odeur, la texture, le goût et l'arrière goût de la pâte sont jugés par l'absence de défauts (sur une échelle de 1 à 9). Ils sont répertoriés dans le tableau 2.

1.1.4. L'Ossau-Iraty dans l'univers technologique des fromages AOP au lait de brebis

[Medina & Nuñez \(2004\)](#) ont considéré six principales familles de fromages de brebis parmi les fromages produits : les fromages frais, conservés en saumure, à pâte dure ou semi-dure, les pâtes persillées, les pâtes filées et les fromages élaborés avec du lactosérum. La classification proposée dans le tableau 1 s'appuie sur ces critères mais aussi sur des critères supplémentaires liés à la technologie de fabrication comme la nature du lait (pur brebis ou mélange), le type de présure utilisée (végétale ou animale), la température de chauffage du caillé après coagulation et la texture de la pâte après affinage. Selon la classification proposée tableau 1, l'Ossau-Iraty est ainsi un fromage de brebis au lait entier, coagulé avec de la présure animale, à pâte non cuite, semi-dure à dure. Il se rapproche fortement des fromages espagnols Roncal, Idiazábal, Manchego et Zamorano ([Martínez. et al., 2011](#)), du fromage portugais Terrincho, des fromages italiens Fiore Sardo et Pecorino Toscano affiné ([Medina & Nuñez, 2004](#) ; [Pirisi et al., 2011](#)). Il se rapproche aussi du fromage Swaledale mais celui-ci a un affinage plus court (3 à 4 semaines).

Comme l'Ossau-Iraty, la majorité des fromages AOP fabriqués exclusivement à partir de lait de brebis (12/25) sont fabriqués à l'aide de préparations coagulantes animales et sont des fromages à pâte non cuite, semi-dure ou dure. Cependant, 9 des 25 AOP sont fabriquées à l'aide de préparations coagulantes végétales (extraits de la plante *Cynara cardunculus*). Ce sont notamment 6 des 7 fromages produits au Portugal et 2 des 6 fromages espagnols. Même si la plupart des fromages de brebis sont coagulés à l'aide de préparations coagulantes animales commerciales, des préparations spécifiques, sous forme de pâte issue de caillettes d'agneau, sont utilisées pour fabriquer certains fromages italiens (Fiore Sardo, Pecorino Siciliano, Pecorino Romano, Pecorino di Filiano, Canestrato Pugliese, Piacentinu Ennese). L'utilisation de levains dits naturel, appelé *scotta-inesto* et résultant de l'incubation de lactosérum résiduel à plus de 40°C provenant de la fabrication de Ricotta, est une pratique courante aussi bien pour les fromages à pâte semi-cuite (Pecorino Romano, Sardo et di Filiano) que pour les fromages à pâte non cuite en AOP (Fiore Sardo, Canestrato Pugliese, Pecorino Siciliano, Pecorino Tosacano, Piacentinu Ennese) (Tableau 1) ou sans AOP (Pecorino del Poro). Toutefois, la possibilité d'ensemencer le lait avec un tel mélange et/ou avec des souches autochtones sélectionnées n'est mentionnée que dans le cahier des charges du Pecorino Romano. Le recours à des levains lactiques «faits maison» par maturation de petites quantités de lait à haute température pendant au moins 12 heures) est autorisé pour le fromage Slovène Bovški sir (<http://www.ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>). Des procédés traditionnels d'immersion du caillé au moment du tranchage et/ou des fromages moulés dans du lactosérum chaud ou dans de l'eau chaude sont parfois utilisés dans la fabrication de certains fromages italiens et de l'Oscipek (Medina & Nuñez, 2004). Enfin, certains fromages ont la possibilité d'être fumés.

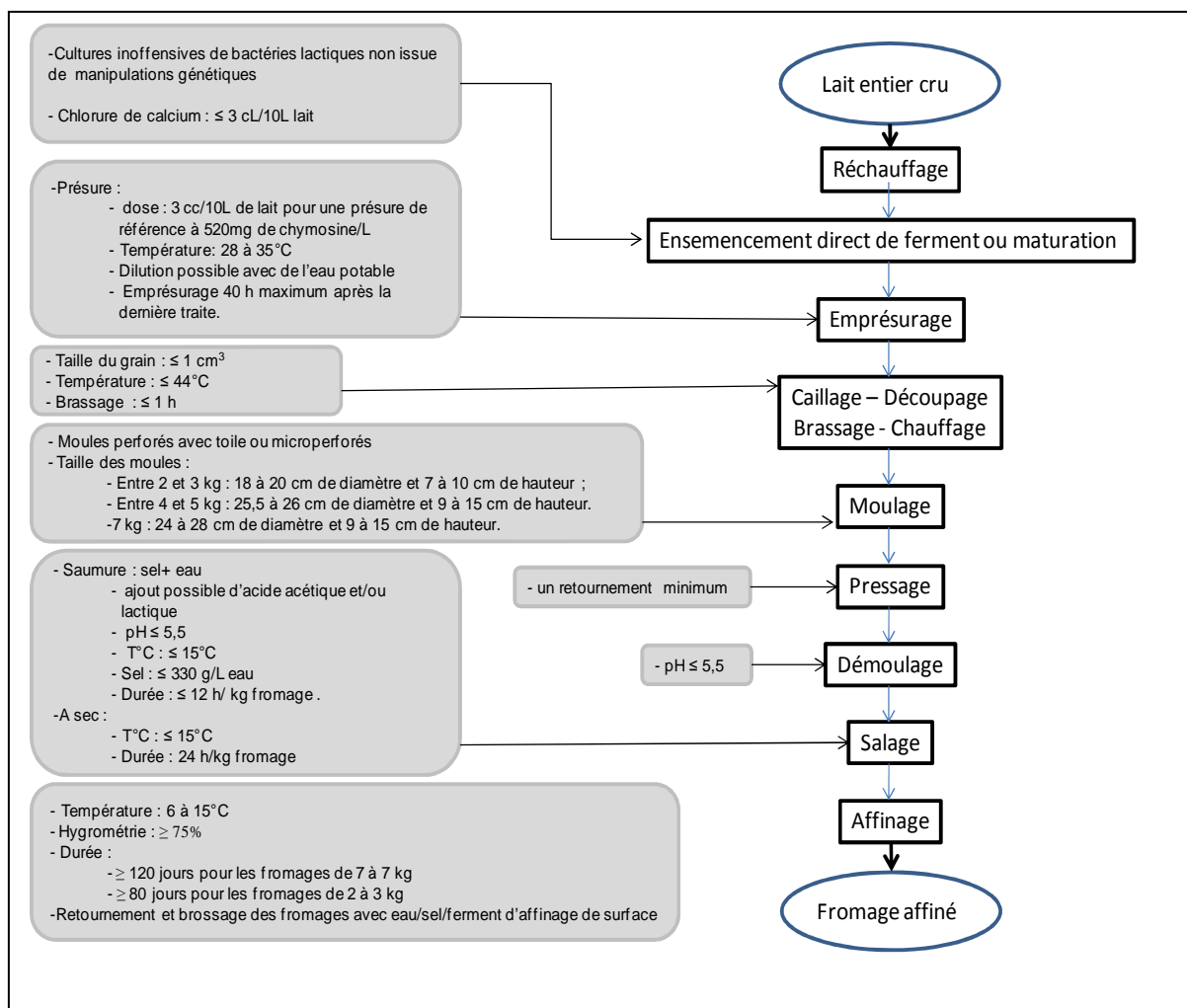


Figure 2. Schéma technologique de fabrication de l'AOP Ossau-Iraty au lait cru fermier (ODG Ossau-Iraty, 2014).

Tableau 1. Appellations d'Origine Protégée, enregistrées au niveau de la commission Européenne, attribuées à des fromages élaborés avec du lait de brebis.

Pays	TE	NOMBRE D'AOP / NOM DU FROMAGE					
		Pur brebis		Mélange brebis ± autres espèces			
Allemagne	4	0		0			
Autriche	6	0		0			
Belgique	1	0		0			
Espagne	26	6	Manchego ^{a, 3, 4}	Idiazábal ^{a, 3, 4, §}	4	Flor de Guía ^{a, 1}	Gamonedo ^{e, §}
			Roncal ^{a, 3, 4}	La Serena ^{a, 1, 3}		Cabrales ^e	Picon Bejes-Trevisco ^e
			Zamorano ^{a, 3}	Torta del Casar ^{a, 1}			
France	45	2	Ossau-Iraty ^{a, 3, 4}	Roquefort ^e	1	Broccio ou Brocciu ^e	
Grèce	21	0			18	Batzos ^{f, 3}	Feta ^{f, 2}
						Sfela ^{f, 3}	Anevato ^{a, 1}
						Pichtogalo chanion ^{a, 1}	Kasseri ^{d, 3}
						Graviera Agrafon ^{c, 4}	Graviera Kritis ^{c, 4}
						Kefalograviera ^{b, 4}	Ladotyri ^{b, 4, §}
						Manouri ^g	Katiki ^{a, 1}
Irlande	1	0			0		
Italie	46	9	Canestrato Pugliese ^{a, 4, β, θ}	Fiore Sardo ^{a, 4, §}	3	Pecorino di Picinisco ^{a, 3}	Casciotta d'Urbino ^{b, 1}
			Pecorino di Filiano ^{b, 4}	Pecorino Romano ^{b, 4, β}		Formaggio di Fossa di Sogliano ^{a, 3}	Murazzano ^{a, 1}
			Pecorino Sardo ^{b, 1, 3, β}	Pecorino Siciliano ^{a, 4, β}			
			Pecorino Toscano ^{a, 1, 3}	Piacentinu Ennese ^{a, 3, Ω}			
			Ricotta Romana ^e				
Pays Bas	4	0			0		
Pologne	3	0			3	Oscypek ^{a, 3, §, β}	Bryndza ^{a, 1}
						Redykorka ^{a, 3, §}	
Portugal	11	7	Évora ^{a, 3, 4}	Nisa ^{a, 3}	3	Rabaçal ^{a, 3, 4}	Picante da Beira Baixa ^{a, 3}
			Azeitão ^{a, 3, 4}	Castelo Branco ^{a, 3}		Amarelo da Beira Baixa ^{a, 3}	
			Terrincho ^{a, 3}	Serpa ^{a, 1}			
			Serra da Estrela ^{a, 1}				
Slovénie	4	0			1	Bovški sir ^{a, 3, 4}	
Royaume Uni	10	1	Swaledale ewes cheese ^{a, 3}		0		
Total	182	25			33		

TE : toutes espèces ; **Pâte** : ^a non cuite ; ^b semi cuite ; ^c cuite ; Pâte : ^d filée ; ^e persillée ; ¹ molle ; ² semi molle ; ³ semi dure ; ⁴ dure ; **Fromage** : ^f affiné en saumure, ^g au lactosérum ; § fumage possible ; § conservé dans l'huile d'olive ; £ sel ajouté au lait ; Ω ajout de safran et poivre noir ; ^β ajout possible d'eau chaude et/ou de lactosérum chaud (50-80°C) après découpage et/ou moulage ; ^θ affiné dans un moule en osier et frotté à l'huile et au vinaigre ; présure animale ; végétale animale ou végétale ; Sources complémentaires : Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011 ; Martínez et al., 2011 ; Pirisi et al., 2011 ; Reis et Macalita, 2011 ; Tavaría et Macalita, 2000 ; Medina et Nuñez, 2004 ; <http://www.ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html>, 30/04/2016

Tableau 2. Liste des motifs de refus utilisés pour juger de la conformité sensorielle de la pâte de l'Ossau-Iraty.

Critères		
Odeur	Texture	Goût – Arrière goût
Rance, Fermenté, choux fermenté, ensilage d'herbe, Caillé acidifié, petit lait acide, lait fermenté, Vinaigre, aigre, piquant, aigrelet, Trop d'ammoniac, Fumé, Lait cuit (cramé), caramélisé, Déséquilibre d'odeur (odeur dominante ou manque d'odeur)	Friable, Cassant, Caoutchouc, Collant	Pas assez salé, Trop salé, Sucré, Trop amer, Trop acide, Trop piquant, Cuit, Savon/saponifié, Rance, Moisi

1.2. Les bactéries lactiques des laits et des fromages de brebis

Pour une revue générale des éléments taxonomiques des bactéries lactiques, se référer à [Ludwig et al., 2009](#).

1.2.1. Niveaux et Biodiversité

L'état des connaissances proposé s'appuie essentiellement sur les données microbiologiques collectées lors d'un travail collaboratif réalisé en 2011 sur les produits issus des petits ruminants et publié dans la revue Small Ruminant Research ([Govaris & Maotsou, 2011](#)). Il présente les informations acquises sur les bactéries lactiques isolées principalement de fromages bénéficiant d'une AOP au lait entier de brebis, d'origine italienne ([Pirisi et al., 2011](#)), grecque ([Litopoulou-Tanetaki & Tzanetakis, 2011](#)) et provenant de la péninsule ibérique ([Freitas & Malcata, 2000](#) ; [Martínez et al., 2011](#) ; [Reis et al., 2011](#)), mais aussi sur des travaux menés sur des fromages de brebis traditionnels de l'Europe de l'Est ([Gerasi et al., 2003](#) ; [Prodromodou et al., 2001](#) ; [Pogačic et al., 2011](#) ; [Zora & Snežana, 2008](#)). Il n'existait pas de données pour l'Ossau-Iraty avant ce travail de thèse.

Les principaux résultats sont présentés dans les tableaux 3 et 4. La plupart de ces travaux ont utilisé une approche culture-dépendante associant des dénombrements sur milieu de culture dont la spécificité est souvent remise en cause et une caractérisation phénotypique des isolats. Or, étant donné que les méthodes génotypiques sont reconnues aujourd'hui comme étant les plus fiables en matière de taxonomie, il conviendra de considérer comme «**présumés**» les genres ou espèces de bactéries lactiques dénombrés et/ou identifiés par l'approche culture-dépendante. Le type de méthode utilisée est spécifié dans les résultats présentés dans les tableaux.

1.2.1.1. Dans le lait

Comparativement au lait de vache, peu d'études se sont intéressées spécifiquement à la microflore lactique des laits de brebis. Généralement peu ou pas d'informations sont données sur les conditions de production et de conservation des laits analysés. Il est donc difficile de comparer les résultats obtenus dans ces études. Les tableaux 3a et 3b présentent des données obtenues sur les bactéries lactiques après analyses de laits crus de brebis servant à la fabrication de fromages.

Les lactocoques constituent la flore lactique dominante des laits de brebis (3,7 à 7,5 log UFC/mL) sauf pour le lait de Bastelicaccia où les leuconostocs sont plus nombreux. Les leuconostocs et les lactobacilles sont retrouvés à des niveaux équivalents entre 3 et 6 log UFC/mL et constituent les deuxième et troisième genres de bactéries lactiques des laits de brebis sauf dans le cas du Venaco et du fromage Serra da Estrela où les entérocoques sont plus nombreux. Les entérocoques sont retrouvés à des niveaux variant de 2,9 à 6,8 log UFC/mL mais sont généralement de 4 log UFC/mL dans les laits. Le niveau de Lactobacilles Hétérofermentaires Facultatifs (LHF) mésophiles est le plus faible. Déjà constaté par [Cogan et al. \(1997\)](#), les espèces *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Ln. mesenteroides* et *Ec. faecalis* sont systématiquement présentes dans les laits crus de brebis. Le phénotype *lactis* domine sur le phénotype *cremoris*. Dans les laits servant à la fabrication du Roncal et de l'Idiazábal, technologiquement similaire à l'Ossau-Iraty, l'espèce du phénotype *lactis* représente environ 70% des lactocoques isolés. Le phénotype du biovar *diacetylactis* est l'unique représentant de *Lc. lactis* dans les laits corses ([Casalta et al., 2005](#)).

Les sous espèces *mesenteroides* et *dextranicum* sont les deux sous espèces de l'espèce *Ln. mesenteroides* retrouvées conjointement ou individuellement dans tous les laits. La sous espèce *mesenteroides* est dominante parmi les bactéries à Gram positif isolées de laits de brebis crus réfrigérés (73,3%) ([Nuñez et al., 1984](#)). Sur les 250 souches isolées de laits de brebis argentins, les entérocoques sont phénotypiquement le plus souvent identifiés (48%). Ils prédominent sur les lactocoques (14%), les leuconostocs (8%) et les lactobacilles (30%) ([Medina et al., 2001](#)). *Enterococcus faecalis* est l'espèce dominante parmi les entérocoques des laits de brebis : elle représente par exemple de 80 à 90% des entérocoques isolés des laits de brebis des zones Roncal et Idiazábal. L'espèce *durans* est retrouvée en nombre plus important dans les laits d'hiver et de printemps que dans les laits d'été pour l'Idiazábal ([Arana, 2001](#)). L'espèce *hirae* est aussi présente parmi les entérocoques des laits de brebis de Navarre ([Ortigosa et al., 2008](#)). Associé à l'espèce *Lb. plantarum* et à une proportion variable (40 à 80%) de lactobacilles non identifiés, *Lb. paracasei* représente la flore lactobacille de ces laits de brebis navarrais. L'espèce *Lb. brevis* n'y est isolée que ponctuellement.

Tableau 3a. Niveau des bactéries lactiques (log UFC/mL) dans des échantillons de lait cru utilisés pour la fabrication de quelques fromages de brebis au lait cru.

Genres présumés	Idiazábal	Roncal	Manchego	La Serena	Torta del Casar	Venaco	Serra da Estrela	Bastelicaccia
<i>Lactococcus</i>	4,45 – 7,50	5,35 – 5,98	6,70	-	5,34 - 6,16	≈ 5	6,56	3,87
<i>Leuconostoc</i>	3,65 – 6,88	4,50	4,00	4,81	5,18 - 5,46	2 - 3	6,38	4,01
<i>Lactobacillus</i>	3,18 – 6,86	4,68 – 5,09	5,34	5,73	4,12 – 5,16	≈ 3	6,15	-
LHF	-	1,84	-	-	-	3 - 4	-	-
<i>Enterococcus</i>	2.91 – 5.63	3,46 – 4,34	3,90	5,08	3,33 - 3,89	4 - 5	6,83	3,00
Références	(1), (2), (3)	(2), (4), (5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)

Tableau 3b. Espèces et sous espèces de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru utilisés pour la fabrication de quelques fromages de brebis au lait cru.

	Idiazábal	Roncal	Venaco	Nord Ouest Argentin	Fiore Sardo
Genres, espèces et sous espèces de bactéries lactiques identifiés	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar diacetylactis	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar diacetylactis	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar diacetylactis	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	
	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>			
	<i>Lb. brevis</i> *	<i>Lb. brevis</i>		<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. plantarum</i> *	<i>Lb. plantarum</i>		<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>
	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei</i>			<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. paracasei</i> *				<i>Lb. spp</i>
	<i>Lb. spp</i> *				
	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp	
	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	
Références	<i>Ec. faecalis</i> *	<i>Ec. faecalis</i>	<i>Ec. faecalis</i>	<i>Ec. spp</i>	<i>Ec. faecalis</i>
	<i>Ec. faecium</i> *	<i>Ec. faecium</i>	<i>Ec. faecium</i>		<i>Ec. faecium</i>
	<i>Ec. durans</i> *	<i>Ec. avium</i>	<i>Ec. spp</i>		<i>Ec. avium</i>
	(2), (4), (12)	(2), (13)	(9)	(14)	(15)

LHF : Lactobacilles Hétérofermentaires Facultatifs ; dans le tableau 2b, les identifications ont été réalisées par des méthodes phénotypiques sauf mention * où une PCR spécifique a été utilisée ; les espèces ou sous espèces soulignées sont dominantes au sein du genre ; (1) Pérez-Elortondo et al., 1993 ; (2) Arizcun, 1995 ; (3) Salméron et al., 2002 ; (4) Oneca, 2002 ; (5) Ortigosa, 2002 ; (6) Núñez & Martínez-Moreno, 1976 ; (7) Fernández del Pozo et al., 1989 ; (8) Poulet et al., 1991 ; (9) Casalta, 2003 ; (10) Sousa & Malcata, 1997 ; (11) Casalta et al., 2001 ; (12) Ortigosa et al., 2008 ; (13) Arana, 2001 ; (14) Medina et al., 2001 ; (15) Mangia et al., 2008

1.2.1.2. Dans les fromages

La microflore du **Roquefort**, une des plus anciennes AOC fromagères (1925), a été documentée par les travaux de Devoyod et collaborateurs dès les années 1970. Le Roquefort est un fromage persillé dont le lait mis en fabrication est usuellement inoculé avec un levain mésophile. Des spores de *Penicillium roquefortii* sont ajoutées au lait ou saupoudrées sur les caillés au moment du moulage. La microflore lactique est essentiellement constituée de lactocoques (*Lc. lactis*) et de leuconostocs (*Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*) qui se maintiennent tout au long de l'affinage (Devoyod et al., 1968). Les lactobacilles (essentiellement *Lb. casei*) sont à leur niveau maximum jusqu'au 10^{ème} jour, juste avant le salage (Devoyod, 1970) et diminuent après le salage. Les entérocoques (essentiellement *Ec. faecalis*) diminuent jusqu'au salage, augmentent au cours du salage et varient peu durant l'affinage (7 log UFC/g) (Devoyod, 1969). Aucune donnée plus récente n'a pu être trouvée.

Le **Manchego**, fromage à pâte pressée non cuite élaboré avec de la présure animale (Tableau 1), est le fromage de brebis AOP espagnol dont la production est la plus importante avec 8815 tonnes en 2010 (Martínez et al., 2011). Sa microflore lactique est largement documentée (Tableau 4) (Freitas & Malcata, 2000 ; Nieto-Arribas et al., 2009a, 2009b, 2010, 2011). La microflore aérobie mésophile revivifiable augmente fortement durant les premiers jours d'affinage et atteint sa valeur maximale à 7 jours (de l'ordre de 9 log UFC/g de fromage). Elle se retrouve à des niveaux de 8 log UFC/g à 90 jours. Les lactocoques, principalement *Lc. lactis* subsp. *lactis*, prédominent durant le premier mois puis sont dépassés par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs principalement *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* et *Lb. paracasei* qui dominent pendant l'affinage (Sánchez et al., 2006). Les entérocoques, principalement *Ec. durans*, les leuconostocs, principalement *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, et les pédiocoques, principalement *Pedococcus pentosaceus*, sont aussi retrouvés en nombre important. Les premières données acquises par Ordoñez et al. (1978) indiquaient que les espèces *Ec. faecalis*, *Lb. casei* et *Lc. lactis* étaient les espèces de bactéries lactiques les plus abondantes dans le fromage Manchego. Des travaux plus récents (Nieto-Arribas et al., 2009a, 2009b, 2010, 2011) ont montré la diversité génotypique existant au sein des populations de lactobacilles, lactocoques, leuconostocs et entérocoques isolés de fromages Manchego artisanaux. Pour l'**Idiazábal**, de technologie similaire au Manchego (Tableau 1), les lactocoques augmentent pendant la phase de coagulation, pressage et salage (Pérez-Elortondo et al., 1999). Parmi les bactéries lactiques isolées du lait, du caillé et du fromage affiné (Tableau 4), 53% appartiennent au genre *Lactococcus*, 37 % au genre *Lactobacillus* et le reste au genre *Leuconostoc* (Rua et al., 1993). Les principales espèces sont *Lc. lactis*, majoritairement le phénotype *Lc. lactis* subsp. *lactis*, ainsi que *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Ec. faecalis*. *Ec. faecium*, *Ec. casseliflavus*, *Ec. hiraе* et *Ec. durans* ont aussi été mis en évidence parmi les entérocoques identifiés (Ortigosa et al., 2008). Le phénotype *diacetylactis* a été majoritairement

retrouvé parmi les isolats de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Pérez-Elortondo et al., 1998 ; Rua et al., 1993). Parmi les leuconostocs, l'espèce *Ln. lactis* est majoritairement retrouvée par Rua et al. (1993) et Pérez-Elortondo et al. (1998) alors que Arizcun (1995) a essentiellement identifié l'espèce *Ln. mesenteroides*. *Lb. plantarum* est retrouvé essentiellement dans le lait et dans le caillé et *Lb. paracasei* dans le fromage affiné (Pérez-Elortondo et al., 1998). Les mêmes espèces et sous espèces, quasi dans les mêmes proportions sont retrouvées dans le **Roncal** (Tableaux 1 et 4), de technologie similaire à l'Idiazábal (Arizcun, 1995 ; Oneca et al., 2003). Dans le fromage **La Serena**, qui diffère technologiquement de l'Ossau-Iraty par l'utilisation de la présure végétale, les lactocoques, les lactobacilles et les leuconostocs atteignent leur niveau le plus élevé à 15 jours d'affinage avec des dénombrements de $4,2 \times 10^9$ UFC/g, $1,8 \times 10^9$ UFC/g, $4,2 \times 10^8$ UFC/g respectivement. Le nombre de LAB revivifiables diminue progressivement à partir de quinze jours jusqu'à la fin de l'affinage (Fernández del Pozo et al., 1989). Les phénotypes *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Ln. mesenteroides* et *Ec. faecium* prédominent dans le fromage (Freitas & Malcata, 2000).

Les bactéries lactiques sont un groupe prédominant des fromages de brebis artisanaux portugais **Serra da Estrela** (Tavaria & Malcata, 1998), **Azeitao** (Mimoso et al., 1992), **Évora** (Freitas & Malcata, 2000), **Serpa** (Roseiro et al., 2003) et **Terrincho** (Pintado et al., 2008) dans lesquels leurs niveaux atteignent 6 à 9 log UFC/g de fromage en fin d'affinage (30 à 180 jours selon les fromages). Plusieurs travaux sur la microbiologie du fromage portugais le plus traditionnel, le **Serra da Estrela** (Tableau 4), fabriqué avec de la présure végétale (Tableau 1), décrivent les dénombrements microbiens et l'identification des bactéries lactiques (Freitas & Malcata, 2000). Le nombre de bactéries lactiques augmente durant la première semaine de 3 à 4 log ufc/g de fromage par rapport à leur niveau initial dans le caillé (approximativement 2 à 4 log UFC/g). Par la suite, il augmente plus lentement entre 7 et 21 jours d'affinage et se stabilise à 35 jours à un niveau de 7 log UFC/g. Les espèces *Lc. lactis*, *Ec. faecium* et *Ln. mesenteroides* sont dominantes dans le caillé avec des fréquences respectives de 43, 27 et 18% des bactéries lactiques identifiées. *Ln. lactis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* et *Lb. plantarum* sont retrouvés respectivement à de plus faibles fréquences, environ 9, 2 et 1 %. *Ln. lactis* est l'espèce la plus fréquente (jusqu'à 72 % des bactéries lactiques identifiées) et se maintient sur toute la période d'affinage tandis que les fréquences de *Ec. faecium* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* diminuent fortement, suivi par *Ln. mesenteroides*. Dans le fromage **Évora** (Tableau 1), *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Pedicococcus* spp. sont les bactéries lactiques présentes dans le fromage de 3 à 7 jours d'affinage. Les entérocoques sont continuellement présents entre 3 et 45 jours d'affinage à un niveau de 4 à 5 log UFC/g (Freitas & Malcata, 2000).

La microflore lactique des fromages de brebis AOP italiens fait partie de celle qui est la plus

documentée (Tableau 4). Le **Pecorino Sardo** et le **Pecorino Romano** (Tableau 4) sont habituellement produits à partir de lait thermisé auquel est rajouté le *scotta-inesto* (voir paragraphe 1.1.4). Pour le premier, *Lc. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *St. thermophilus* et *Ec. spp.* sont les principales espèces de bactéries lactiques isolées (Mannu et al., 2000b, 2002 ; Madrau et al., 2006). Les nombres de lactobacilles mésophiles et d'entérocoques augmentent durant l'affinage (5 à 7 log UFC/g et 5 à 8 log UFC/g respectivement). Pour le deuxième, les espèces *St. thermophilus* (environ 5-6 log UFC/g) et *Lb. delbrueckii* apportées au lait par l'intermédiaire du *scotta-innesto*, sont présentes durant toute la période d'affinage avec les entérocoques (tels que *Ec. durans*, *Ec. faecium*, environ 7 log UFC/g), les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles (tels que *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, environ 8 log UFC/g) et obligatoires thermophiles tel que *Lb. fermentum*. Dans le fromage **Pecorino di Filiano**, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (> 7 log UFC/g) appartenant aux espèces *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei* (Coda et al., 2006) représentent la microflore dominante lorsqu'il est fabriqué au lait cru sans addition de levains.

Le fromage **Canestrato Pugliese** est aujourd'hui principalement fabriqué avec du lait pasteurisé qui est inoculé avec un levain acidifiant, principalement composé de bactéries lactiques thermophiles (Aquilanti et al., 2006). A 2 mois d'affinage, les entérocoques sont à un niveau de 3 à 4 log UFC/g tandis que les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont à des niveaux entre 5 et 7 log UFC/g (Albenzio et al., 2001). A 12 mois d'affinage, les entérocoques et les lactobacilles thermophiles sont retrouvés à des niveaux de l'ordre de 6 log ufc/g tandis que les lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs représentent les bactéries lactiques dominantes (> 7 log UFC/g) (Di Cagno et al., 2003). Dans le **Fiore Sardo**, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (> 7 log UFC/g) associés aux entérocoques (> 6 log UFC/g) sont les bactéries lactiques qui colonisent le fromage (Mannu et al., 2000a ; Di Cagno et al., 2003 ; Pisano et al., 2006) contrairement aux lactocoques qui sont essentiellement cultivables jusqu'à 1 mois d'affinage. *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Ec. faecium*, *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei* sont les espèces les plus représentées et *Streptococcus thermophilus* est l'espèce occasionnellement retrouvée (Pisano et al., 2006). (Tableau 4). Dans le **Pecorino Siciliano** (Tableau 1) les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles sont représentés par *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. curvatus*. Parmi les coques, *Lactococcus*, *Enterococcus* (*Ec. faecium* et *Ec. faecalis*), *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* ont été identifiés (Randazzo et al., 2006 ; Vernile et al., 2008). Dans le **Pecorino Toscano** (Tableau 1) élaboré avec du lait est thermisé ou pasteurisé et inoculé avec le *scotta inesto* (voir paragraphe 1.1.4) ou un levain sélectionné, les bactéries lactiques sont principalement représentées par des coques mésophiles (environ 6-7 log UFC/g) et des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs comme *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei* et *Lb. plantarum* (environ 5-6 log UFC/g). Les entérocoques sont présents à des niveaux plus faibles (environ 3 log UFC/g) (Bizzarro et

al., 2000). Dans le **Pecorino del Poro** élaboré avec du lait cru sans addition de starter exogène, à pâte semi-dure ou dure, la microflore lactique est majoritairement composée de coques durant toute la période d'affinage (28 jours), entre 6,7 et 12,4 log UFC/g pour les mésophiles et entre 2,3 et 9,9 log UFC/g pour les thermophiles. Leurs niveaux les plus élevés sont atteints à 14 jours. Les niveaux de lactobacilles mésophiles et thermophiles augmentent tout au long de l'affinage, variant entre 4,8 log UFC/g en début d'affinage à 11,7 log UFC/g en fin d'affinage pour les mésophiles et de 2,9 à 8,1 log UFC/g pour les thermophiles (Caridi et al., 2003).

Pour le fromage grec **Feta** au lait cru, uniquement élaboré avec du lait de brebis (Tableau 1), les entérocoques (*Ec. faecalis*, *Ec. faecium*, *Ec. durans*) qui atteignent des niveaux de l'ordre de 8 log UFC/g en début d'affinage en saumure diminuent à 5 log UFC/g après 1 mois tandis que les lactobacilles (*Lb. paraplantarum* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*) augmentent de 6,8 log UFC/g à 8 log UFC/g (Vassiliadis et al., 2009) (Tableau 4). A ce stade, les lactocoques (principalement *Lc. lactis* subsp. *lactis*) ne constituent plus la microflore cultivable dominante puisqu'ils ne sont plus détectés, à cause de l'effet inhibiteur du sel (teneur en sel 6%). Les leuconostocs ne sont plus détectés à 60 jours d'affinage, tout comme les entérocoques tandis que les lactobacilles mésophiles composent seuls, la microflore NSLAB à 60 jours d'affinage. Dans l'**Orynotyri** (non AOP), élaboré avec du lait cru de brebis sans levain exogène, les entérocoques dominent dans le fromage frais (10 jours d'affinage) (8,2 log UFC/g) mais à 3 mois d'affinage, ils sont dépassés par les lactocoques (8,2 log UFC/g) (Prodromou et al., 2001). Les lactobacilles mésophiles sont présents à un niveau de 5,8 log UFC/g. *Ec. faecalis* et *Lc. lactis* sont les espèces les plus fréquemment isolées de ce fromage. Le **Manura**, fromage grec de brebis à pâte non cuite (non AOP), est immergé dans le vin rouge après quelques mois d'affinage. La microflore lactique se maintient à un niveau de l'ordre de 8 log UFC/g durant l'affinage mais diminue de moitié après immersion dans le vin (Gerasi et al., 2003). Peu de lactocoques ont été isolés de ce fromage. *Ln mesenteroides* constitue la principale espèce isolée de la pâte et de la surface des fromages du fromage frais et affiné mais *Pediococcus pentosaceus* et *Lb. paracasei* ont aussi été fréquemment isolés. Après immersion dans le vin, les principales espèces retrouvées appartenaient aux espèces *Lb. bifementans*, *Lb. brevis* et *Pc. pentosaceus*.

Pour l'**Oczypek**, (Tableau 1) pur brebis, les dénombrements moyens de lactocoques, lactobacilles, streptocoques et entérocoques sont maxima dans le caillé avant salage (respectivement 6-7, 6-7, 7-8 et 2-3 log UFC/g) et diminuent après chauffage (addition d'eau) et salage (respectivement 2-3, 5-6, 5-6 et 1-2 log UFC/g) (Majcher et al., 2011). Les nombres diminuent encore d'environ 1 log après

Tableau 4. Bactéries lactiques identifiées à partir de quelques fromages AOP de brebis.

	Feta	Fiore Sardo	Idiazábal	Manchego	Ozcypek	P. Romano	P. Sardo	P. Siciliano	P. Toscano	Roncal	Serra da Estrela
<i>Lactococcus</i> spp.			x					x			
<i>Lc. lactis</i>			x							x	x
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	x	x	x	x	x		x		x	x	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	x	x	x		x*					x	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diactetylactis</i>		x	x	x						x	
<i>Lc. garvieae</i>					x						
<i>Lc. raffinolactis</i>	x	x	x		x						
<i>Enterococcus</i> spp.		x	x				x	x			
<i>Ec. avium</i>	x		x							x	
<i>Ec. durans</i>	x	x	x	x	x*	x				x	
<i>Ec. faecalis</i>	x	x	x	x	x*			x		x	
<i>Ec. faecium</i>	x	x	x	x		x		x		x	x
<i>Ec. gallinarum</i>			x								
<i>Ec. hirae</i>	x		x								
<i>Ec. italicus</i>					x*						
<i>Ec. saccharolyticus</i>	x										
<i>Leuconostoc</i> spp.								x			
<i>Ln. citreum</i>					x						
<i>Ln. lactis</i>		x	x		x					x	x
<i>Ln. mesenteroides</i>					x						x
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	x		x							x	
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	x	x	x	x						x	
<i>Ln. paramesenteroides</i>			x		x*					x	
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>					x*						
<i>Lactobacillus</i> spp.		x	x								
<i>Lb. acidophilus</i>			x	x						x	
<i>Lb. brevis</i>	x	x		x	x*		x		x		
<i>Lb. buchneri</i>	x								x		
<i>Lb. casei</i>		x	x		x*	x	x			x	
<i>Lb. coryniformis</i>		x									
<i>Lb. curvatus</i>		x	x	x		x		x	x		
<i>Lb. delbrueckii</i>			x				x			x	
<i>Lb. fermentum</i>		x		x		x					
<i>Lb. graminis</i>		x									
<i>Lb. helveticus</i>							x				
<i>Lb. paracasei</i>	x	x		x	x			x	x		x
<i>Lb. paraplantarum</i>	x	x									
<i>Lb. parabuchneri</i>					x*						
<i>Lb. pentosus</i>		x		x				x			
<i>Lb. plantarum</i>	x	x	x	x	x			x	x	x	x
<i>Lb. rhamnosus</i>	x	x						x			
<i>Lb. sake</i>		x									
<i>Lb. viridescens</i>		x									
<i>Streptococcus</i> spp.								x			
<i>St. thermophilus</i>		x			x		x		x		
<i>St. salivarius</i>					x						
<i>St. vestibularis</i>					x						
<i>Pediococcus</i> spp.								x			
<i>Pc. pentosaceus</i>				x							
<i>W. confusa</i>	x										
Références	(1)	(2) (3) (4)	(5) (6) (7) (8)	(9) (10) (11)	(12)	(13)	(14) (15) (16)	(17) (18)	(19)	(5)	(20)

P : Pecorino ; Identification : x phénotypique ; x génotypique (PCR) ; x phénotypique & génotypique (PCR) ; x* séquençage ; x séquençage & DGGE ; x DDGE. (1) Vassiliadis et al., 2009 ; (2) Consentino et al., 2004 ; (3) Mannu et al., 2000a ; (4) Pisano et al., 2006 ; (5) Arizcun (1995) ; (6) Ortigosa et al., 2008 ; (7) Pérez-Elortondo et al., (1998) ; (8) Rua et al., 1993 ; (9) Freitas et Malcata, 2000 ; (10) Ordoñez et al. (1978) ; (11) Sánchez et al., 2006 ; (12) Alegría et al., 2012 ; (13) Pirisi et al., 2011 ; (14) Madrau et al., 2006 ; (15) Mannu et al., 2000b ; (16) Mannu et al., 2002 ; (17) Randazzo et al., 2006 ; (18) Vernile et al., 2008 ; (19) Bizzarro et al., 2000 ; (20) Tavaría & Malcata, 1998.

fumage sauf pour les entérocoques qui se maintiennent à un niveau stable. Les composés phénoliques formés durant le fumage seraient en cause étant donné leur pouvoir bactéricide (Majcher et al., 2011). *Lc. lactis* subsp. *lactis* est la sous espèce prédominante du fromage, confirmé à la fois par des tests phénotypiques et des méthodes culture indépendante (DDGE) (Alegria et al., 2012). *Lb. casei* and *Lb. plantarum*, sont les espèces de lactobacilles les plus fréquemment identifiées. *Ln. citreum*, *Ln. lactis* et *Ln. mesenteroides* constituent la majorité des leuconotocs producteurs de dextrane. Les espèces minoritaires étaient *St. thermophilus*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* et les espèces d'*Enterococcus*. Certaines espèces comme *Lc. garvieae*, *Lc. raffinolactis*, *Tetragenococcus halophilus*, et *St. salivarius* n'ont été mises en évidence que par DDGE.

1.3. Intérêt technologique des principales LAB décrites pour l'Ossau-Iraty

Cette partie s'attache à décrire l'intérêt technologique en fromagerie des principales LAB décrites pour l'Ossau-Iraty et les applications connues dans la fabrication de fromage de brebis. Les éléments descriptifs liés à leur taxonomie et à leur innocuité ne seront pas traités ici mais elles sont décrites dans la revue établie par Stiles & Holzapfel (1997) et les publications dédiés à chaque genre lactique auquel elles appartiennent (Bernardeau et al., 2008 ; Casalta & Montel, 2008 ; Delorme, 2008 ; Ogier & Serror, 2008 ; Ogier et al., 2008).

De façon générale, cinq principales capacités métaboliques des LAB sont d'intérêt en fromagerie. Ce sont leurs capacités à : acidifier durant le procédé de fabrication du fromage, à résister aux attaques phagiques, à produire des composés qui vont contribuer à la genèse des caractéristiques sensorielles des fromages, à produire des bactériocines, et à produire des exopolysaccharides (Leroy & De Vuyst, 2004). On met le plus souvent en évidence le potentiel métabolique de souches pures, car on recherche leurs capacités en se mettant dans des conditions favorisant l'expression des potentiels métaboliques associés. Ces potentiels pourront ou non s'exprimer dans le lait puis dans le fromage lors de la transformation fromagère, selon l'environnement dans lequel se trouve placée chaque souche.

Deux autres capacités métaboliques peuvent être recherchées, la capacité de résistance aux antibiotiques, qui peut être naturelle ou acquise pour certains groupes de LAB, mais aussi la capacité à produire des amines biogènes, potentiellement allergisantes chez des sujets sensibles, bien que les concentrations relevées jusqu'à présent dans les fromages ne présenteraient pas un problème de santé (Mathur & Singh, 2005 ; Montel et al., 2014 ; Stratton et al., 1991).

1.3.1. *Lactococcus lactis*

L'espèce *Lc. lactis* spp. est largement utilisée en production fromagère, en premier lieu pour sa capacité à métaboliser rapidement le lactose en acide L(+) lactique grâce à la capacité de beaucoup de souches de cette espèce à utiliser les caséines du lait comme source d'azote. Cette espèce joue un rôle essentiel dans l'acidification de nombreuses variétés de fromages, en particulier à pâte molle et pressée non cuite. Elle entre dans la composition de levains lactiques commerciaux à vocation acidifiante ([Wouters et al., 2002](#)) appelés *starter* en anglais (SLAB). Plus de 100 millions de tonnes métriques de lait seraient annuellement transformées à l'aide de starters comprenant des souches de *Lc. lactis* à travers le monde et plus de 10^{18} cellules ingérées par la population humaine annuellement, ce qui reflète leur importance industrielle et économique ([Mills et al., 2010](#) ; [Parente et al., 2004](#)). Les critères de choix de souches de cette espèce pour l'élaboration de levains sont essentiellement des critères de capacité acidifiante et de résistance phagique ([Marshall, 1991](#)).

Une autre fonction des lactocoques est de produire différents composés qui vont contribuer à l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages. Parmi ces composés, les acides non volatils (acide lactique, succinique, pyruvique, oxalique, acides gras moyens et longs), les acides gras à courte chaîne, volatils (C_2 à C_6), des aldéhydes, cétones, alcools, esters et produits soufrés sont principalement rencontrés dans les produits fermentés. Les lactocoques ont la capacité de produire ces composés à partir du lactose, du citrate, des lipides, et/ou des acides aminés ([Mc Sweeney, 2004](#)).

Ils sont aussi capables de produire de nombreux composés antimicrobiens à l'encontre d'espèces bactériennes potentiellement pathogènes et d'espèces fongiques ([Gupta & Goel, 1993](#)). La production d'EPS a été bénéfique dans l'amélioration de la texture de fromage Cheddar allégé en gras ([Costa et al., 2010](#)). De plus, la production d'EPS pourrait aider les souches contre les attaques de bactériophages en bloquant la phase d'adsorption du phage ([Forde & Fitzgerald, 2003](#)).

Etant donné l'objet du mémoire de thèse qui s'intéresse à la sélection et à l'application de souches sauvages de *Lc. lactis* pour la fabrication d'Ossau-Iraty au lait cru, l'application de l'espèce *Lc. lactis* en fromagerie sera plus particulièrement détaillé dans le paragraphe 1.4.

1.3.2. *Streptococcus thermophilus*

Cette espèce de LAB est considérée comme étant la seconde plus importante espèce de LAB utilisée en industrie laitière après *Lactococcus lactis* avec un marché estimé à environ 40 milliards de dollars et plus de 10^{12} cellules ingérées annuellement par la population humaine ([Iyer et al., 2010](#)).

Parmi les propriétés technologiques et fonctionnelles de *St. thermophilus* passées en revue par [Iyer et al. \(2010\)](#), sa capacité à acidifier rapidement le lait lorsque des températures élevées sont

appliquées est majeure. Sa particularité réside dans le fait que contrairement à *Lc. lactis*, il est généralement incapable de métaboliser le galactose issu de l'hydrolyse du lactose. *St. thermophilus* est notamment utilisé dans la fabrication du yaourt en association avec *Lb. delbrueckii* mais aussi dans l'élaboration de certaines variétés de fromages, en particulier à pâte cuite (par exemple, le Comté, Parmesan, Mozzarella) puisque c'est une espèce thermophile. Toutefois, *St. thermophilus* intervient aussi dans la fabrication de certaines variétés de fromages de brebis italiens à pâte semi cuite et non cuite (Tableau 1 ; paragraphe 1.2.1.2) puisqu'il est ajouté au lait de fabrication par l'intermédiaire d'une préparation basée sur l'incubation du lactosérum de la fabrication antérieure à plus de 40°C. Ce levain dit naturel, appelé *scotta-innesto*, (Pirisi et al., 2011) sélectionne des LAB thermophiles, dont *St. thermophilus*, qui se retrouvent ensuite dans le fromage. L'incorporation de souches de *St. thermophilus* à des mélanges de souches mésophiles comme *Lc. lactis* a été expérimentée en Cheddar (Champagne et al., 2009 ; Michel et Martley, 2001) et ce type de mélange est devenu une proposition commerciale des fournisseurs de levains pour la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite (Elsborg, 1997) comme en attestent de nombreux exemples en fromages de brebis technologiquement similaires comme l'Ossau-Iraty (voir chapitre 2), le Manchego et l'Idiazábal (Sánchez et al., 2006 ; Pérez-Elortondo et al., 1993) et en fromages de chèvre (Olarte et al., 2000). Certains auteurs y voient la possibilité de contrôler l'acidification durant les étapes de fabrication (Champagne et al., 2009), d'autres, une piste dans la stratégie de lutte contre les attaques bactériophagiques (Stokes et al., 2001).

St. thermophilus a aussi d'autres propriétés d'intérêt comme la production d'exopolysaccharides (EPS), de bactériocines et de vitamines mais aussi une utilisation potentielle en tant que probiotique (Iyer et al., 2010). La production d'EPS est surtout exploitée dans le domaine des laits fermentés au niveau de leur texture. Awad et al. (2005) ont cependant testé l'effet de souches de *St. thermophilus* productrices d'EPS dans la production de Cheddar allégé en gras afin de compenser les modifications de texture due à la perte de gras mais n'ont pas obtenu de résultat significatif. Aucun exemple en lait ou fromage de brebis n'a été recensé dans la littérature. *St. thermophilus* est la seule LAB connue pour avoir une activité uréase significative (Champagne et al., 2009). Le caractère basique de l'ammoniaque produit lors l'hydrolyse de l'urée présent dans le lait ralentit temporairement la vitesse d'acidification lors de la fabrication fromagère (Pernoud et al., 2004). *St. thermophilus* est capable de produire de nombreux composés d'arôme et de saveur (Herlinck et al., 2004 ; Smit et al., 2005) mais il n'existe pas de données sur un effet en fromage de l'addition de *Streptococcus thermophilus* comme levain acidifiant.

1.3.3. Lactobacilles mésophiles

Les lactobacilles mésophiles font partie de la microflore désignée sous le terme NSLAB (Non Starter

Lactic Acid Bacteria). Les lactobacilles NSLAB fréquemment rencontrés dans le fromage sont membres du groupe des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LHF). Les espèces les plus fréquemment isolées sont *Lb. para(casei)*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. curvatus* (Beresford et al., 2001). Ils sont apportés par le lait cru et/ou l'environnement de la fromagerie. Ils ne se développent généralement pas bien dans le lait et ne contribuent pas à la production d'acide lactique dans le caillé mais font preuve d'une grande robustesse entraînant une forte capacité invasive dans le fromage au cours de l'affinage. Ils font ainsi partie de la flore majoritaire de beaucoup de fromages affinés quelle que soit l'espèce animale, en pâte non cuite et cuite (Beresford et al., 2001). De nombreux exemples sont cités dans les fromages de brebis dans le paragraphe 1.2.1.2. Ils peuvent même constituer la flore bactérienne dominante lors de l'affinage de certains fromages fabriqués avec du lait pasteurisé (Linberg et al., 1996 ; McSweeney et al., 1993). L'espèce *Lb. paracasei* domine plus tardivement dans les fromages (Beresford et al., 2001).

Leur intérêt principal en fromagerie réside dans leur influence sur les caractéristiques organoleptiques des fromages affinés. De nombreuses études, en particulier, en fabrication de Cheddar, ont permis de le démontrer (McSweeney et al., 1993 ; Rehman et al., 2000). Beaucoup d'auteurs ont mis en évidence les activités protéolytique et lipolytique de ces bactéries dans le fromage (par exemple Broome et al., 1990). Ils peuvent aussi participer directement à la production de composés aromatiques majeurs comme l'acide formique, l'acide succinique (Demarigny et al., 1996). Ils sont capables de métaboliser le citrate et de produire du diacétyl (Hungenholz, 1993 ; Jimeno et al., 1995). Ils peuvent aussi produire du gaz (CO₂).

En outre, certains défauts d'affinage peuvent être attribués à la présence de lactobacilles mésophiles. Ainsi, la racémisation du L-Lactate en D-Lactate par certains lactobacilles peut entraîner l'apparition de cristaux blancs et amers de lactate de calcium. Liée au taux de matière grasse et à l'activité protéolytique, la production de gaz par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et stricts peut favoriser l'apparition de gonflements, d'écaillures, voire de lainures parfois humides dans la pâte des fromages.

La sélection de souches de lactobacilles mésophiles est donc apparue comme une étape incontournable pour la formulation de levain d'affinage. De nombreux essais de sélection et/ou d'ensemencement ont été réalisés, en Cheddar en particulier (Dasen et al., 2003 ; Bernardeau et al., 2006 ; Phillips et al., 2006) mais aussi sur des fromages de brebis à affinage long tels que le Roncal (Irigoyen et al., 2007 ; Ortigosa, 2002 ; Ortigosa et al., 2006 ; Oneca et al., 2007), l'Idiazábal (Mendia et al., 2000), le Manchego (Nieto-Arribas et al., 2009b ; Poveda et al., 2003), le Serra da Estrela (Macedo et al., 2004), le Venaco (Casalta et al., 2005), le Fiore Sardo (Mangia et al., 2008 ; Mannu et al., 2000a ; Pisano et al., 2007), le Pecorino Sardo (De Angelis et al., 2001 ; Madrau et al., 2006 ; Mangia et al., 2013). Dans les essais de fabrications menés, les espèces de lactobacilles mésophiles

les plus fréquemment inoculées étaient *Lb. para(casei)* et *Lb. plantarum*. Des différences significatives au niveau sensoriel entre les fromages avec et sans lactobacilles ont été mesurées dans tous les cas sauf dans le cas rapporté par [Madrau et al. \(2006\)](#) malgré le constat d'un niveau de protéolyse plus élevé et par [Mendia et al. \(2000\)](#) et [Mangia et al. \(2008\)](#) où les caractéristiques sensorielles n'ont pas été évaluées.

1.3.4. Leuconostocs

Tout comme les lactobacilles mésophiles, les leuconostocs font partie de la microflore NSLAB des environnements laitiers. L'espèce *Ln mesenteroides* et dans une moindre mesure l'espèce *Ln. lactis* sont les plus utilisées en technologie laitière. Elles se retrouvent dans la composition de levains mésophiles sélectionnés pour la production de beurre, de crèmes, de fromages à pâte molle ou semi dure tels que l'Edam et le Gouda et des fromages à pâte persillée tel que le Roquefort ([Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004](#) ; [Vedamuthu, 1994](#)).

Leur intérêt en technologie laitière et fromagère repose sur leur potentiel métabolique : pour la production d'arômes notamment par leur capacité à produire de l'acétaldéhyde, du diacétyl et de l'acétoïne à partir du lactate et du citrate; pour la texturisation de certains produits liquides ou semi liquides (lait fermenté, lait aromatisé, yaourt, crèmes lactées) par leur capacité à produire des exopolysaccharides ; pour l'ouverture des pâtes de certains fromages par la production de CO₂ comme dans le cas du Roquefort, favorisant ainsi l'implantation de *Penicillium roquefortii* ; pour la préservation des produits par leur capacité à produire des substances inhibitrices de micro-organismes pathogènes ou indésirables ([Devoyod & Poullain, 1988](#) ; [Hemme & Foucaud-scheunemann, 2004](#) ; [Vedamuthu, 1994](#)).

Ces propriétés technologiques expliquent l'émergence de travaux de typage et de caractérisation du potentiel technologique de souches isolées de fromages au lait cru dans le but de les introduire dans la composition de levains sélectionnés ([Alegria et al., 2013](#) ; [Bonomo & Salzano, 2013](#) ; [Cardamone et al., 2011](#) ; [Cibik et al., 2000](#) ; [Nieto-Arribas et al., 2010](#) ; [Morandi et al., 2013](#) ; [Sánchez et al., 2005](#)).

Les tests mis en place dans deux essais recensés pour la fabrication de fromages traditionnels de brebis ont utilisé des souches de *Lc. mesenteroides* sélectionnées qui ont été introduites dans des levains en association avec des lactocoques. L'objectif était d'observer l'effet de l'utilisation de ce type de mélange sur les caractéristiques sensorielles du produit comparativement et respectivement à l'utilisation d'un levain commercial et d'un levain composé uniquement de souches de lactocoques. Les conclusions de ces études convergent vers une différence significative des caractéristiques sensorielles des fromages fabriqués avec les mélanges lactocoques-leuconostocs, pour du Manchego au lait pasteurisé ([Poveda et al., 2003](#)) et du Venaco au lait cru ([Casalta et al., 2005](#)).

1.3.5. Les entérocoques

Enterococcus est le plus controversé des genres de bactéries lactiques en fabrication fromagère. Cette controverse est due au fait que les entérocoques sont à la fois des bactéries d'intérêt technologique par le potentiel métabolique qu'elles offrent principalement dans le développement de composés d'arômes et dans la production de bactériocines mais aussi des bactéries potentiellement à risque d'un point de vue de la santé humaine et animale puisque leur plasticité génétique leur permet d'une part, de s'adapter rapidement à de nombreux environnements et d'autre part, d'être des vecteurs d'antibiorésistance et de virulence bactérienne qui posent problème en milieu hospitalier (Laverde Gomez et al., 2011). Par conséquent, contrairement aux autres groupes de bactéries lactiques présentées avant, les entérocoques ne bénéficient pas du statut GRAS (Ogier & Serror, 2008). Ils font l'objet de nombreuses revues (Foulquié-Moreno et al., 2006 ; Franz et al., 1999, 2003, 2011 ; Giraffa et al., 2003 ; Kayser, 2003). La phylogénie, la taxonomie, l'habitat et les caractéristiques générales du genre *Enterococcus* y ont été décrites.

Homofermentaires mais dotés d'un pouvoir acidifiant assez faible, les entérocoques sont généralement isolés de fromages pour étudier leur potentiel métabolique lié à la production de composés aromatiques pendant l'affinage des fromages : protéolyse, peptidolyse, lipolyse, activité estérasique, et utilisation du citrate (Giraffa, 2003). Toutefois, certains travaux les mettent en cause dans la détérioration des caractéristiques sensorielles (Lopez-Diaz et al., 1995 ; Thompson et al., 1986). Les espèces les plus fréquemment caractérisées technologiquement sont aussi les espèces les plus fréquemment isolées aussi bien de fromages à base de lait cru qu'à base de lait pasteurisé : *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* et *Ec. durans* (Giraffa et al., 2003). Parmi les travaux menés sur des fromages de brebis, Arizcun et al. (1997), Cosentino et al. (2004) et Nieto-Arribas et al. (2011) ont ainsi exploré le potentiel technologique de 282, 118 et 132 souches d'entérocoques isolées respectivement de Roncal et d'Idiazabal, de Fiore Sardo, de Manchego afin d'en sélectionner et de les introduire dans un levain.

Des souches de *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* et *Ec. durans* ont été testées en combinaison avec des LAB mésophiles ou thermophiles dans la fabrication de fromages à pâte semi cuite et non cuite (Giraffa, 2003). Généralement, la présence de ces entérocoques sélectionnés a affecté de façon positive le profil sensoriel des fromages, dont les fromages de brebis Venaco (Casalta & Zennaro, 1997), Feta Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993) et Fiore Sardo (Pisano et al., 2007). L'utilisation de souches d'*Ec. faecium* et *Ec. faecalis* productrices de bactériocines a été évaluée dans l'élaboration de quelques fromages de brebis. Dans le premier cas, la complexité de la matrice fromagère a interféré sur la production d'entéroisine anti-*Listeria*, pourtant constatée in vitro (Sarantinopoulos et al., 2002). Cette

capacité métabolique semble fortement dépendante de leur environnement dans l'écosystème fromage et de la technologie appliquée (Giraffa, 2003). Dans le deuxième cas, l'objectif était d'augmenter la protéolyse des fromages en augmentant la lyse bactérienne induite par la production de bactériocine de la souche (Garde et al., 1997) et ainsi d'accélérer l'affinage. Les fromages fabriqués avec 0,003% de la culture de la souche sélectionnée de *Ec. faecalis* ont développé des caractéristiques sensorielles plus rapidement (30 jours au lieu de 45 jours) que les fromages sans ajout.

Enfin, l'utilisation de souches d'entérocoques pour leurs propriétés probiotiques n'a pas été relevée dans la bibliographie pour la fabrication de fromages de brebis. Elle a néanmoins été testée dans la fabrication de fromage Cheddar (Franz et al., 2011). La souche de *Ec. faecium* ensemencée est restée viable dans le fromage durant 9 à 15 mois d'affinage à 8°C et les composés volatils odorants ont été intensifiés. Cette souche a été autorisée à être introduite dans un levain à destination de produits laitiers fermentés (Giraffa, 2003).

1.4. Application de souches *Lc. lactis* sauvages en fabrication fromagère

1.4.1. Intérêt général

Par opposition aux lactocoques des levains commerciaux, la dénomination «sauvage» est attribuée aux lactocoques lorsqu'ils viennent d'être isolés de produits laitiers fermentés artisanaux au lait cru sans ajout de cultures de levains commerciaux, ou d'environnements non laitiers (Wouters et al., 2002). Les environnements non laitiers dans lesquels *Lc. lactis* a été retrouvé sont très variés (pain au levain, fruits, végétaux, graines, sol, matériel et litière de ferme, peau et muqueuse animales) mais de plus en plus de travaux convergent aujourd'hui vers le fait que les souches laitières ont une origine végétale (Cavanagh et al., 2015). Dans de tels environnements, les micro-organismes subissent de nombreux stress liés aux variations des facteurs abiotiques du milieu, à l'intense compétition pour des nutriments présents de façon hétérogène (Gibbons & Rinker, 2015). Ils s'y adaptent et développent des capacités métaboliques particulières qui ne sont pas ou plus retrouvées chez des souches dites "domestiquées" c'est à dire des souches utilisées depuis longtemps dans des levains lactiques (Passerini et al., 2010).

La recherche de souches sauvages est partagée à la fois par les producteurs de levains commerciaux, et par les fromagers à l'échelle industrielle et artisanale. Elle leur permettrait d'élargir le potentiel technologique offert par les levains, car ceux actuellement mis sur le marché par quelques firmes commerciales en mouvance (Tableau 5), généralement, dépendent d'un nombre limité de souches et sont issus de lignées génétiques conduisant à des profils génotypiques et des caractéristiques phénotypiques similaires (Hansen, 2002 ; van Hylckama Vlieg, et al., 2006). Ce constat est

particulièrement vivace et primordial pour les filières fromagères artisanales, qui voient, à travers cette recherche, une manière i/ de travailler avec des souches plus adaptées à la variabilité de leur matière première (lait mis en œuvre), ii/ de préserver un patrimoine microbien local, iii/ de maintenir une certaine typicité du fromage, en particulier dans le cas de ceux bénéficiant d'une Appellation d'Origine Protégée (Bertozzi & Panari, 1993) mais aussi, iv/ de ne plus dépendre des producteurs de levains commerciaux. Outre le caractère sauvage des souches, la source des souches, lait et/ou fromages d'une aire géographique donnée, est un critère de choix pour les fromagers traditionnels conduisant à rechercher des souches sauvages autochtones.

Tableau 5. Fournisseurs de levains industriels à usage alimentaire (Hansen, 2002)

Société	Pays
Alce	Italie
ASCRC	Australie
Centro Sperimentale del Latte	Italie
Chr. Hansen	Danemark
CSK	Pays Bas
Danisco	Danemark
Degussa	Allemagne
DSM	Pays Bas
Gewürzmüller	Allemagne
Lallemand	Canada
NZDRI	Nouvelle Zélande
Quest International	The Netherlands
Rhodia	France

1.4.2. Caractéristiques évaluées

De nombreux travaux se sont multipliés ces dernières décennies afin d'isoler et de caractériser des souches de *Lc. lactis* sauvages, à la recherche de capacités métaboliques diversifiées, adaptées et nouvelles. Le tableau 6 présente une liste non exhaustive des potentialités technologiques de *Lc. lactis* qui ont ainsi été explorées *in vitro* à partir de souches sauvages isolées de lait et fromages

traditionnels de vache (Peñamellera, Cabrales, Afuega'l Pitu, Arzua-Ulloa, Cebreiro, Tetilla), de chèvre (Armada, Batzos, fromages corses) et de brebis (Manchego, Beyaz, Pecorino Sardo).

Leur potentiel acidifiant reste un critère majeur de sélection ([Casalta et al. 1995](#) ; [Cogan et al. 1997](#) ; [Gaya et al., 1999](#) ; [Jeanson et al., 2003](#) ; [Mannu et al., 2000b](#) ; [Psoni et al., 2007](#) ; [Sánchez et al., 2000](#)).

La comparaison des potentiels de plusieurs souches ne peut se faire que dans des conditions expérimentales identiques : lait de même composition, même couple temps-température appliqué, même nombre de bactéries ensemencées et même état physiologique des bactéries ensemencées. Les conditions n'étant pas standardisées entre les différentes études et souvent même au sein d'une même étude, les résultats doivent être pris avec précaution. Lorsque les conditions sont identiques, le potentiel acidifiant mis en évidence pour des souches d'une même espèce est lié à la capacité de ces souches à se multiplier et/ou à maintenir un nombre de cellules possédant une même activité métabolique (en particulier en phase stationnaire et de déclin) dans l'environnement qui leur a été imposé.

Parmi les autres capacités métaboliques évaluées, celles liées à la production de composés potentiellement impliqués dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles sont fréquemment retrouvées dans les études sur le sujet. Les voies métaboliques ciblées dans ces études, impliquant de nombreuses activités enzymatiques, sont majoritairement celles qui touchent à la protéolyse primaire et secondaire (activités carboxypeptidasique, dipeptidasique, aminopeptidasique), avec par exemple, une diversité de peptides produits à l'issue de la dégradation des caséines du lait ([Morales et al., 2001](#) ; [Psoni et al., 2007](#)), des mesures d'activités Leu-aminopeptidasique et Lys-aminopeptidasique ([Psoni et al. 2007](#)), la métabolisation de la méthionine par la production de méthaneéthiol, ([Psoni et al., 2007](#)). Dans certains cas, le potentiel "aromatisant" a été évalué par l'appréciation sensorielle de dégustateurs avertis de laits fermentés après ensemencement de chaque souche testée. Des associations entre des souches et des arômes variés ou inhabituels comme des arômes de chocolat et de malt ([Ayad et al., 1999](#)), et des saveurs intenses sucrée, amère ou acide ([Nieto-Aribas et al., 2007](#)) ont pu être faites.

Leur résistance aux phages et la présence de prophage sont aussi deux composantes majeures des tests subis par les souches sauvages de *Lc. lactis* dans la perspective d'une utilisation comme levain.

Le pourcentage de souches résistantes aux phages et/ou lysogènes sont variables selon les études : parmi les 11 souches sauvages de *Lc. lactis* étudiées par [Sánchez et al. \(2000\)](#), 3 étaient lysogènes et 4 ont montré une sensibilité phagique lorsqu'elles ont été confrontées à 41 phages de collection ou issus de lactosérums locaux tandis que 33 des 100 souches de *Lc. lactis* sauvages isolées de fermentations fromagères spontanées d'Afuega'l Pitu, se sont montrées résistantes à une collection de 34 bactériophages et six souches étaient lysogènes ([Madera et al., 2003](#)). Toutefois, [Ayad et al., \(2000\)](#) ont montré que globalement, les souches sauvages de *Lc. lactis* sont particulièrement

résistantes aux phages présents dans les lactosérums locaux et présentent donc un grand intérêt pour l'élaboration d'un levain spécifique pour la fabrication de fromages. Une autre forme de résistance, cette fois-ci à de fortes concentrations en sel, jusqu'à 10%, a aussi été constatée chez des souches sauvages de *Lc. lactis* (Mannu et al., 2000b ; Mannu & Paba, 2002 ; Nieto-Aribas et al., 2009a) alors que les références descriptives de cette espèce de LAB ne mentionnent une croissance possible qu'à un taux maximum de 4% de NaCl.

La production de bactériocines telles que la nisine (A et Z), la diplococcine, la lactocine (Ayad et al., 2002) envers une variété d'espèces bactériennes généralement pathogènes ou indésirables telles que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli* O157 :H7, *Yersinia Enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Ec. faecalis* (Cosentino et al., 2012 ; Dal Bello et al., 2010 ; Psoni et al., 2007) est aussi recherchée.

Enfin, l'inocuité des souches est parfois vérifiée au travers leur résistance aux antibiotiques et la production d'amines biogènes : certaines souches ont montré une résistance à des antibiotiques tels que la bacitracine, la céphalotine, la clindamycine, la streptomycine et la tétracycline (Delgado et al., 2002). La tyramine est l'amine biogène produite par le plus grand nombre de souches de *Lc. lactis* isolées de fromages Manchego (57%) tandis qu'aucune n'a produit de putrescine et que deux étaient faiblement productrices d'histamine (Nieto-Aribas et al., 2009a). Cinq souches de *Lc. lactis* isolées de fromages de vache sur 27 testées produisaient de la tyramine (pas d'histamine, de cadavérine, de putrescine de de tryptamine) (Madera et al., 2003).

1.4.3. *Lc. lactis* sauvages dans des levains pour des fromages traditionnels de brebis

Plusieurs travaux rapportent des essais d'utilisation de souches sauvages de *Lc. lactis* sélectionnées pour la fabrication de fromages traditionnels sous AOP, en vache (Menéndez et al., 2004), chèvre (González et al., 2003 ; González & Zarate 2012) et brebis. Parmi les fromages traditionnels au lait de brebis, on compte les fromages Pecorino Sardo (Ledda et al., 1994 ; Madrau et al., 2006), Venaco (Casalta et al., 2005), Manchego (Centeno et al., 2002 ; Gomez et al., 1999 ; Nuñez, 1976 ; Nuñez et al., 1981 ; Poveda et al., 2003), La Serena (Medina et al., 1991), Serra da Estrela (Macedo et al., 2004), Fiore Sardo (Mangia et al., 2008 ; 2013), Feta (Litopoulou et al., 1993). La plupart de ces études ont mesuré l'effet des souches sauvages sur des fromages fabriqués avec du lait pasteurisé mais très peu avec du lait cru de brebis (Medina et al., 1991 ; Centeno et al., 2002 ; Macedo et al., 2004 ; Casalta et al., 2005). De plus, beaucoup ont utilisé des souches de *Lc. lactis* en combinaison avec d'autres

Tableau 6. Principales capacités métaboliques recherchées chez les souches sauvages de *Lc. lactis* isolées de quelques fromages traditionnels.

Fromages	Acidifiante	Protéolytique/ Caséinolytique/ Aminopeptidasique	Production de composés		Profil Glucidique Enzymatique général	Profil phagique		Inocuité	Référence
			Aromatisants	Antimicrobiens		Lysotypie	Lysogénie		
	x	x		x ^d	x				Gaya et al., 1999
Manchego ^{B*}	x	x x	x ^a		x			x ^f	Nieto-Aribas et al., 2009a
		x							Morales et al., 2001
Pecorino Sardo ^{B*}	x	x	X		x				Mannu et al., 2000b
Beyaz ^B	x	x		x ^{d, e}	x			x ^f	Durlu-Ozkaya et al., 2001
Armada ^{CH}	x	x x x			x				Herreros et al., 2003
Corse ^{CH}	x								Casalta et al., 1995
Batzos ^{CH*}	x	x x x	x ^b	x ^d					Psoni et al., 2007
Arzua-Ulloa ^{V*}	x	x	x ^c	x ^d				x ^{f, g, h}	Delgado et al., 2002
Cabrales ^{V*}		x		x ^d	x*			x ^g	Mayo et al., 1990
	x	x	x ^c	x ^d				x ^{f, g, h}	Delgado et al., 2002
Peñamellera ^V	x	x	x ^c	x ^d				x ^{f, g, h}	Delgado et al., 2002
	x		X	x ^d	x x	x	x		Sanchez et al., 2000
Cebreiro ^{V*}									
	x	x	x ^c	x ^d				x ^{f, g, h}	Delgado et al., 2002
Tetilla ^{V*}									
Afuega'l Pitu ^{V*}	x	x	x ^a			x	x		Madera et al., 2003

^B Fromage de brebis ; ^{CH} Fromage de chèvre ; ^V Fromage de vache ; * bénéficiant d'une AOP

^a diacétyle ; ^b méthanthiol ; ^c Acides volatils et non volatils (Ethanol, acétone, diacétyle, actéoine, acide acétique...) ; ^d Bactériocines ; ^e H₂O₂ ; x* : mesure de l'activité β galactosidase ; ^f Amines biogènes ; ^g résistance aux antibiotiques ; ^h facteurs de virulence (gélatinase, hémolysine...).

souches sauvages (levain acidifiant à souches multiples) de la même espèce (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997 ; Centeno et al., 2002 ; Nuñez, 1976 ; Gomez et al., 1999) ou de genres différents de LAB (voir paragraphes 1.3.2 à 1.3.5) et des microcoques (Menéndez et al., 2004) et peu de façon individuelle (levain acidifiant à souche unique) (Macedo et al., 2004 ; Medina et al., 1991 ; Nuñez et al., 1981). La conception d'un levain à souches multiples permet notamment de limiter le risque d'attaque phagique (Limsowtin et al., 1977) et la complémentation SLAB/NSLAB est utilisée pour allier les potentialités de *Lc. lactis* avec celles, différentes, des NSLAB. Nous limiterons l'étude bibliographique aux résultats obtenus exclusivement avec des souches de *Lc. lactis*. Quelques uns d'entre eux sont présentés dans le tableau 7.

Les effets attendus des levains sauvages autochtones utilisés dans ces différents travaux portent généralement sur trois aspects : l'activité acidifiante mesurée par la diminution de pH dans le fromage, la diminution des niveaux de germes indésirables (entérobactéries, coliformes) et/ou potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) et enfin, les caractéristiques sensorielles du fromage (Tableau 7). Le suivi de la population des lactocoques inoculés accompagnent généralement ces tests. Le phénotype de la sous espèce *lactis* est présent dans tous les levains utilisés, parfois en combinaison avec le phénotype de l'espèce *cremoris* (Centeno et al., 2002) ou du biovar *diacetylactis* (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997).

Globalement, les études s'accordent sur l'effet au moins équivalent ou plus important des souches de *Lactococcus lactis* sauvages sur la diminution de pH engendrée par leur inoculation dans le lait de fabrication comparativement à un contrôle sauf dans le cas du Venaco (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997). Le pH atteint en cours (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997 ; Gomez et al., 1999 ; Macedo et al., 2004 ; Medina et al., 1991 ; Nuñez et al., 1981) ou en fin d'affinage (Gomez et al., 1999 ; Macedo et al., 2004 ; Nuñez et al., 1981) s'abaisse jusque des valeurs inférieures à 5,0.

La baisse de pH est généralement suffisante pour freiner le développement de bactéries indésirables comme les entérobactéries, les coliformes et/ou *Staphylococcus aureus* de façon équivalente (Casalta & Zennaro, 1997) ou plus forte (Macedo et al., 2004 ; Medina et al., 1991). Nuñez et al., (1981) ont établi une corrélation entre l'activité acidifiante des souches considérées très acidifiantes (> 0,25% d'acide lactique produit en 6 heures d'incubation à 30°C dans du lait) avec le pH et le dénombrement de la population de lactocoques mesurés à 7 jours.

Les effets de l'ensemencement avec des levains composés de souches sauvages de *Lc. lactis* sur les caractéristiques sensorielles des fromages sont contrastés. Il ne suffit pas d'ensemencer avec des souches sauvages au lieu d'ensemencer avec des souches commerciales ou de se passer d'ajout volontaire de levain pour améliorer automatiquement les caractéristiques sensorielles des fromages de brebis. En effet, dans le cas du Venaco, l'ensemencement d'une paire de *Lc. lactis* sauvages n'a pas conduit à une différenciation nette des fromages de la part du panel de dégustateurs

comparativement à des fromages fabriqués avec un levain commercial (Casalta & Zennaro, 1997) et dans le cas du fromage La Serena, les caractéristiques sensorielles des deux fromages fabriqués avec une souche de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ont été jugées inférieures à celles du fromage sans levain, à cause notamment, d'une acidité trop présente (Medina et al., 1991). D'autres auteurs incriminent une activité acidifiante trop importante des souches sauvages dans l'apparition de défaut de texture (friable) et de goût (acide, amer) (Macedo et al., 2004) pour des technologies similaires. Les fromages Manchego élaborés avec un levain sauvage autochtone, que le lait utilisé soit cru ou pasteurisé, avaient une texture plus élastique, friable et dure que ceux élaborés avec un levain commercial (Gomez et al., 1999). Dans le cas de l'expérimentation menée par Centeno et al. (2002), l'ensemencement de combinaisons de 4 souches sauvages de *Lc. lactis*, sélectionnées pour leur production de composés d'arôme issus du catabolisme des acides aminés ramifiés (BCV⁺) pour la fabrication de fromages, conduisait à l'augmentation du niveau de protéolyse et de peptidolyse ainsi que la qualité des arômes de ces fromages, surtout lorsque des quantités élevées de ces souches étaient ensemencées.

Le suivi de la population des lactocoques inoculés est le plus souvent réalisé par culture sur des milieux plus ou moins sélectifs pour les lactocoques en permettant de donner une estimation du niveau en microorganismes revivifiables de type : mésophiles aérobies (milieu PCA) (Buchbinder et al., 1951), lactobacilles/pediocoques/leuconostocs (milieu MRS) (De Man et al., 1960) et lactocoques/entérocoques (milieu M17) (Terzaghi & Sandine, 1975), ou plus rarement, streptocoques lactiques (milieu TSE) (Turner et al., 1962). Les concentrations des levains en cuve sont peu ou pas renseignées. Lorsque des indications sont apportées, les quantités d'ensemencement du lait sont estimées en volume de levain acidifiant/ volume de lait en cuve. Selon les études recensées, elle vont de 1% (Gomez et al., 1999) à 1⁰/₀₀ (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997). Seuls les travaux sur le Venaco (Tableau 7) précisent la concentration finale du levain en cuve de 6 log UFC/mL. Généralement, des niveaux de l'ordre de 9 à 10 log UFC/g sont atteints dans le caillé puis lors des deux premiers jours d'affinage (Casalta et al., 2005 ; Casalta & Zennaro, 1997 ; Macedo et al., 2004 ; Medina et al., 1991). Des niveaux maxima ont été recensés à 7 jours (~12 log UFC/g) pour le fromage Serra da Estrela (Macedo et al., 2004), à 15 jours (~10 log UFC/g) pour le Venaco (Casalta & Zennaro, 1997), à 7 (jusqu'à 10,5 log UFC/g) ou 30 jours (~10 log UFC/g) pour le Manchego (Medina et al., 1991 ; Nuñez et al., 1981). En fin d'affinage, les niveaux dénombrés sont généralement de l'ordre de 7 à 8 log UFC/g. Le manque de spécificité des milieux de culture destinés à dénombrer les bactéries lactiques tels que les lactocoques est un fait avéré, surtout lorsque des microbiotes complexes comme ceux des fromages fabriqués à partir de lait cru sont analysés (Callon et al., 2004). La recherche des génotypes correspondant aux souches sauvages de *Lc. lactis* sauvages ensemencées pour la fabrication de Venaco a été entreprise par Casalta et al. (2005) pour compléter les

dénombrements réalisés sur milieu de culture et s'assurer de l'implantation de souches lors de la fabrication et de l'affinage du fromage. Le typage génétique a été réalisé par Rep-PCR (paragraphe 1.5.4.), sur des isolats collectés à partir de fromages fabriqués avec la combinaison de deux souches sauvages de *Lc. lactis* (Tableau 7). Les résultats montrent que les souches inoculées s'implantent dans le fromage (Casalta et al., 2005) et qu'elles restent présentes jusqu'à la fin de l'affinage (45 jours) mais que chacune d'entre elles suit une dynamique distincte. Elles représentaient en effet la majorité des isolats après 2 et 15 jours puis près de 50% des isolats après 30 jours. La souche Lc20 était davantage présente après 15 jours en association avec des souches présentant un profil génotypique différent de ceux des souches de *Lc. lactis* sauvages et considérées comme provenant du microbiote du lait cru.

Certains travaux ont testé les capacités antimicrobiennes de souches sauvages de *Lc. lactis* productrices de nisine contre le développement de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Dal Bello et al, 2007) et *Clostridium* (Martinez-Cuesta et al., 2010) dans les fromages en les ensemençant dans le lait. Des résultats prometteurs ont été obtenus pour *Staphylococcus aureus* (réduction de 3,5 log ufc/g en 60 jours) mais pas pour *Listeria monocytogenes* (Dal Bello et al, 2007). Martinez-Cuesta et al. (2010) ont montré que la lacticine 3147 produite par la souche IFPL 3593 était capable de prévenir les gonflements tardifs des fromages par *Clostridium* et représentaient une bonne alternative au lysozyme, potentiellement allergène. Une souche sauvage autochtone de *Lc. lactis* productrice de nisine (ESI 515) a été testée avec succès lors de la fabrication de Manchego (Rodríguez et al., 1998). Après 60 jours d'affinage, les dénombrements de *Listeria innocua* étaient 4 log ufc/g plus faibles dans ces fromages que dans les fromages sans ajout de ce levain. La production de nisine a été détectée tout au long de l'affinage du fromage.

Enfin, le type de levain utilisé pour la fabrication du fromage de brebis Zamorano a eu une influence significative sur le contenu du fromage en amines biogènes durant toute la période d'affinage (Renes et al., 2014). Il était plus bas dans les fromages fabriqués avec un levain composé entièrement avec des souches sauvages autochtones de *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* comparativement à un levain commercial utilisant les mêmes sous espèces.

Tableau 7. Principaux résultats obtenus à partir de quelques études utilisant des souches de *Lc. lactis* sauvages pour la fabrication de fromages traditionnels de brebis.

Fromage Type de lait Référence	Souches utilisées / Contrôle	Baisse de pH	Diminution de bactéries indésirables	Caractéristiques sensorielles	Croissance et implantation des lactocoques
Venaco ¹ Brebis, cru <i>Casalta et al., (2005)</i>	1 paire de LLL ^G -LLD ^G (Lc43-Lc202)	pH minimum : 4,90 à 7 jours pH 5,41 à 30 jours	-	-	Dénombrements sur milieu M17 + Rep-PCR : pendant les deux premiers jours (x 1.5), 8 log UFC/g jusqu'en fin d'affinage. Bonne implantation jusqu'en fin d'affinage – Dominance de Lc43 à 2 et 15 jours puis de Lc202.
<i>Casalta & Zennaro, (1997)</i>	3 paires LLL ^P -LLD ^P (Lc43-Lc202 ; Lc43-L119 ; Lc43-Lc178) / starters commerciaux ou souches CNRZ à base de LL	Pendant la première semaine : valeur minimum 4,6. Plus lente / contrôles. Remontée du pH entre 15 et 30 jours. pH 5,1 à 45 jours.	Coliformes totaux et fécaux : Equivalente au contrôle	Différence entre souches autochtones et contrôle peu détectée (2 tests / 5) à cause d'une acidité trop prononcée.	Dénombrements de microflore totale (milieu PCA), et microflore lactique mésophile (milieux M17 et MRS) équivalente à ceux des contrôles.
La Serena ^{1,3} Brebis, cru <i>Medina et al., (1991)</i>	1 LLL ^P (INIA 399) / sans starter	Plus important dans les fromages avec LLL : différence de 0,5 dans le caillé/contrôle. pH 5,95/6,45	Entérobactéries, coliformes et <i>Staphylococcus aureus</i> : plus forte / contrôle (-2,55, -2,40, -0,29 log UFC/g).	LLL ^P moins bien notées que le contrôle ; en partie due à une acidification LLL ^P plus poussée.	Dénombrements de microflore totale (milieu PCA): ~9 log UFC/g avec pic à 30 jours, > contrôle jusqu'à 30 jours.
Manchego ^{3,4} Brebis, cru <i>Centeno et al., (2002)</i>	2 paires BBV ⁺ et BBV ⁻ de 1 LLL ^G + 1 LLC ^G / levain commercial (3 LLL + 1 LLC)	pH plus élevé (5,17 vs 5,07-5,11) à 60 jours lorsque utilisation de BBV ⁺ à dose élevée.	-	Quantité plus importante de 30 composés volatils lorsque utilisation de BBV ⁺ à dose élevée.	Dénombrements de microflore lactique (milieu MRS): 7,8-8,1 log UFC/g à 60 et 120 jours. Pas d'effet significatif du type de souches utilisé.
Manchego ^{3,4} Brebis, pasteurisé <i>Nuñez et al., (1981)</i>	34 LLL ^P testées individuellement	pH moyen : 4,86 à 7 jours avec souches les plus acidifiantes	Les fromages élaborés avec les souches les plus acidifiantes contiennent le moins de coliformes	Les fromages fabriqués avec les souches les moins acidifiantes sont moins bien notés.	Dénombrements de streptocoques lactiques (milieu TSE) plus élevés à 7 jours avec les souches les plus acidifiantes (9,66 log ufc/g vs 9,05-9,39)
Serra da estrela ¹ Brebis, cru <i>Macedo et al., (2004)</i>	1 LLL ^{NI} /sans starter	pH < pH contrôle 4,85 vs 5,50 à 63 jours	Niveaux d'entérobactéries plus faibles dans les fromages avec LLL /contrôle (4,61 vs 5,15 log ufc/g à 63 jours)	Evaluation sensorielle globale moins bien notée avec LLL ^{NI} (acidité, amertume, texture cassante	Dénombrements de lactocoques présumés (milieu M17)> contrôle durant l'affinage. Pic à 7 jours (11,48 vs 9,22 log ufc/g).

LLL : *Lc. lactis* subsp *lactis* ; LLC : *Lc. lactis* subsp *cremoris* ; LLL : *Lc. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* ; ^P : phénotype ; ^G : génotype ; ^{NI} : non indiqué ; BCV⁺ : productrices de composés d'arôme ramifiés ; BCV⁻ : non productrices de composés d'arôme ramifiés ; ¹ pâte molle ; ² pâte semi molle ; ³ pâte semi dure ; ⁴ pâte dure (voir tableau 1).

1.5. L'approche moléculaire culture-dépendante pour l'étude des dynamiques de souches.

1.5.1. Choix méthodologique

Le lait cru et le fromage issu de lait cru sont des écosystèmes complexes (Quigley et al., 2013). La dynamique des populations microbiennes au sein de ces écosystèmes est crucial pour les caractéristiques des fromages affinés (Montel et al., 2014). L'approche dynamique de tels écosystèmes suppose l'utilisation d'outils techniques discriminants et fiables qui rendent compte de la présence et du niveau des genres, espèces, sous espèces et/ou souches qui se succèdent dans le temps. Elle englobe donc des objectifs d'identification, de discrimination de souches et de quantification.

Avec l'explosion ces 20 dernières années des outils moléculaires, les possibilités d'investigation des écosystèmes microbiens fromagers par les microbiologistes ont considérablement été élargies et le niveau de précision et de fiabilité atteint a été considérablement amélioré. Ces outils sont basés pour de nombreux d'entre eux sur l'analyse des séquences ADN. En particulier, les techniques servant à l'identification taxonomique sont très souvent basées sur les gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr) 16S(bactéries) et 18S (levures, champignons) et les séquences intergéniques 16S-23S (bactéries) et 18S-28S (levures champignons). Elles exploitent des techniques d'hybridation, des techniques de polymérisation en chaîne (PCR), des techniques utilisant des enzymes de restriction et de plus en plus des techniques de séquençage. De nombreuses revues bibliographiques ont ainsi vu le jour ces dix dernières années, et encore très récemment pour rendre compte de l'évolution des outils disponibles pour l'étude des écosystèmes des matrices alimentaires (Giraffa, 2004 ; Justé et al., 2008), telles que le fromage (Jany & Barbier, 2008 ; Ndoye et al., 2011 ; Quigley et al., 2011), ou spécifiquement pour l'étude des bactéries lactiques (Temmerman et al., 2004 ; Ben Amor et al., 2007 ; Randazzo et al., 2009).

Deux approches sont aujourd'hui proposées pour étudier les niveaux et la composition taxonomique des populations microbiennes dont les bactéries lactiques, présentes dans les fromages (Beresford et al., 2001 ; Temmerman et al., 2004 ; Ndoye et al., 2011 ; Quigley et al., 2011 ; Randazzo et al., 2009) : une approche globale permettant d'avoir une image des populations dominantes à un instant t et qui repose sur des techniques dites culture-indépendantes et une approche plus ciblée visant à étudier plus précisément un groupe lactique particulier et ses caractéristiques. Cette dernière repose sur des techniques dites culture-dépendantes. Ces deux approches diffèrent par le type d'informations obtenu et sont donc présentées comme complémentaires pour l'étude des communautés microbiennes associées aux aliments (Justé et al., 2008 ; Randazzo et al., 2009).

La diversité intra-espèces est inaccessible par l'approche culture-indépendante. Cet élément a donc logiquement orienté le choix méthodologique vers l'approche culture-dépendante et les méthodes

qui y sont associées (Figure 3). Seules celles-ci seront développées dans la suite de ce mémoire. Afin de suivre l'évolution des LAB présentes dans le fromage, les méthodes choisies doivent répondre de manière fiable aux objectifs d'identification et de discrimination génotypique intra-espèces. Même si les méthodes dites phénotypiques sont utiles pour évaluer leur potentiel métabolique dans des conditions données, les méthodes dites génotypiques sont aujourd'hui les méthodes retenues pour identifier les LAB et tracer des souches d'une même espèce (Temmerman et al., 2004).

Le principal avantage de ces techniques d'identification taxonomique et de traçage basées sur l'analyse de l'ADN est qu'elles reposent sur la structure primaire des acides nucléiques et non sur les produits codés par les gènes (ARN puis protéines). Ces méthodes peuvent être séparées en deux groupes : les méthodes directes qui déterminent ou ciblent des séquences présentes dans le génome des micro-organismes (séquençage, PCR spécifique, hybridation de sondes) et les méthodes dites indirectes qui fournissent des informations de différenciation des micro-organismes sans connaissance exacte de la structure primaire des acides nucléiques (typage génétique) (Wolfgang, 2007). Même si leur coût a diminué au fil des années, les techniques génotypiques ont toutefois quelques limites, notamment au niveau de l'expérience technique et interprétative, des équipements et des bases de données nécessaires à l'obtention et à l'interprétation des résultats.

Le tableau 8 liste les techniques fréquemment appliquées dans l'identification et la discrimination des bactéries lactiques et présente, pour chacune, leurs avantages et leurs inconvénients en terme de reproductibilité, charge de travail et pouvoir discriminant. L'utilisation de ces techniques depuis quelques années permet aujourd'hui d'avoir le recul nécessaire sur leur fiabilité dans l'identification et la discrimination des bactéries du genre à la souche. L'espèce *Lc. lactis* a été impactée puisque ces dernières années, la caractérisation génotypique a largement remplacé la caractérisation phénotypique pour la désignation de ses sous-espèces *lactis* et *cremoris*. Cela a notamment permis de révéler la contradiction entre l'analyse de l'ARNr 16S et le phénotype observé. Il convient donc aujourd'hui de préciser si l'identification de *Lc. lactis* est génotypique ou basée sur des critères phénotypiques. Kelly et al. (2010) suggèrent même de spécifier génotype et phénotype pour désigner la sous-espèce d'une souche. Seules les techniques génotypiques ayant fait leur preuve seront détaillées ici.

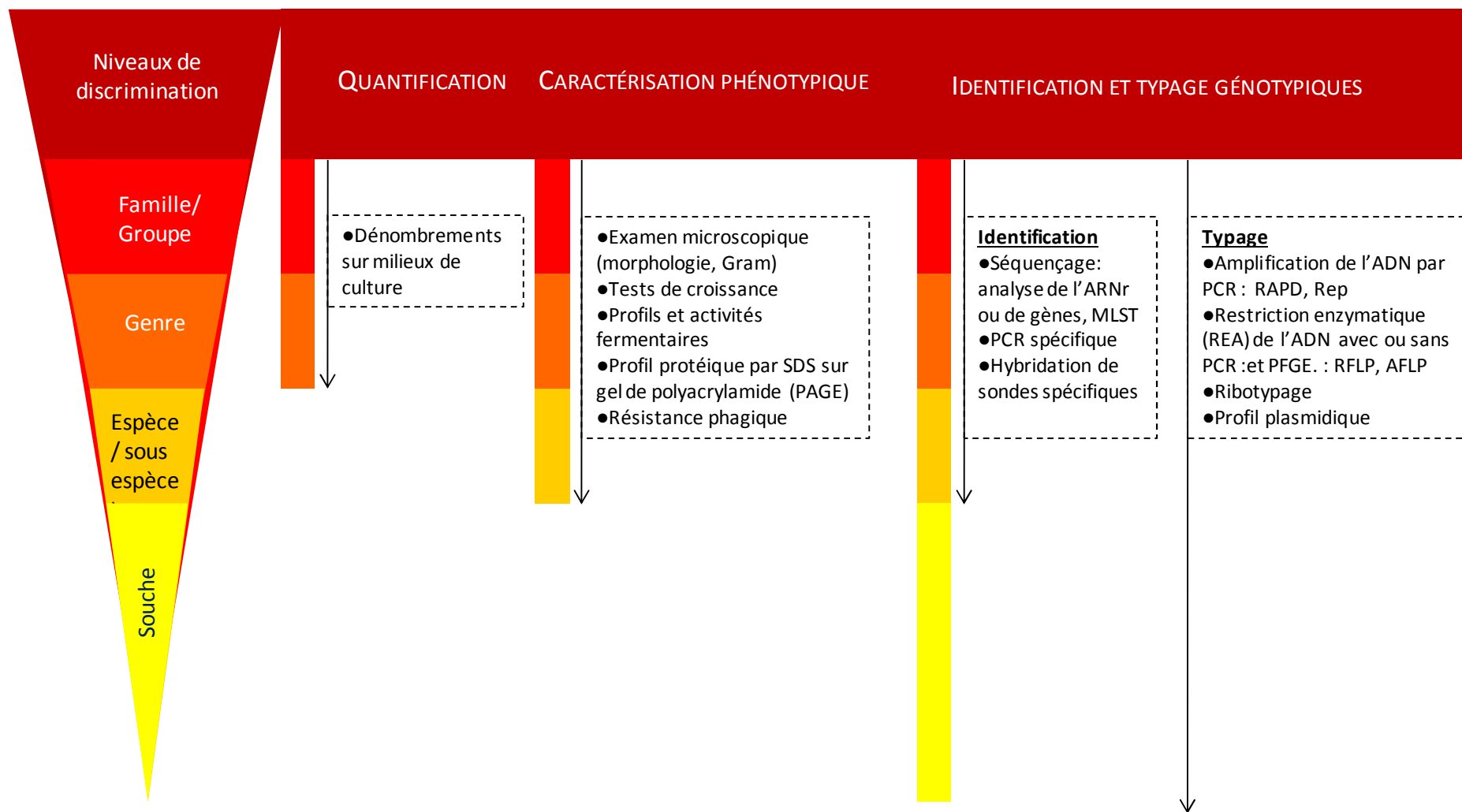


Figure 3. Principales méthodes associées à l'approche culture-dépendante pour quantifier, caractériser, identifier et typer génotypiquement les bactéries lactiques selon le niveau taxonomique à atteindre. Schéma modifié de [Callon & Montel, 2011](#)

Tableau 8. Liste modifiée* des méthodes génotypiques fréquemment utilisées pour l'identification taxonomique et la discrimination taxonomique des bactéries lactiques dans le cadre d'une approche culture-dépendante (Temmerman et al., 2004).

Technique	Principe	Charge de travail	Pouvoir discriminant	Reproductibilité
PCR	avec des amorces spécifiques	F	Dépend des amorces	H
Séquençage	Détermination de la séquence de l'ADN 16S	F*	Genre à l'espèce	H
RFLP	Analyse des profils de restriction enzymatique (REA)	M	Espèce à la souche	H
AFLP	Combinaison de la REA et d'une amplification par PCR	H	Espèce à la souche	H
RAPD-PCR	Amplification par PCR de séquences au hasard	F	Espèce à la souche	F
Rep-PCR	PCR ciblant des séquences répétitives dispersées	F	Espèce à la souche	H
PFGE	REA et électrophorèse en champ pulsé	H	Souche	M
Ribotypage	REA et hybridation de sonde	H	Espèce à la souche	H
Hybridation de sondes	Hybridation ADN-ADN avec des sondes marquées	H	Genre à l'espèce	H

F : faible ; M : Modéré ; H : Haute.

* En une dizaine d'années, la charge de travail liée au séquençage (et son coût) a été grandement abaissée du fait de la possibilité de le sous-traiter auprès de plateformes spécialisées qui proposent des prestations de services.

1.5.2. L'ADN ribosomal bactérien

La connaissance du génome bactérien et en particulier de l'ADN ribosomique, a permis d'élaborer des outils spécifiques de classification et d'identification des bactéries lactiques (Schleifer et al., 1995). Le ribosome bactérien est constitué de 2 sous unités : 50S et 30S (Huybens et al., 2009) (Figure 4). La sous-unité 30S est constituée d'un ARN ribosomique, le 16S et d'une vingtaine de protéines, tandis que la sous-unité 50S est composé de deux ARN ribosomiques le 23S et le 5S et d'une trentaine de protéines (Noller, 1984). Les gènes codant ces trois ARN ribosomiques sont appelés respectivement ADNr 16S, ADNr 23S et ADNr 5S. Ces trois gènes font partie des gènes dont les séquences sont les plus conservées. Ils sont situés sur le même opéron au sein du génome bactérien (Figure 4). Ils peuvent servir de marqueur universel pour les eubactéries par exemple, car ils comportent des régions ADN très conservées au cours de l'évolution des eubactéries. Par contre ils comportent aussi des régions ADN plus variables. Ce sont celles-ci qui seront ciblées pour discriminer du genre à l'espèce (Wang et al., 2007). Par contre, ils ne présentent pas de variabilité

intra-espèce et ne peuvent pas être utilisés pour déterminer une diversité génotypique intra-espèce. Ils sont séparés par des zones codantes et/ou non, plus ou moins longues en fonction des espèces bactériennes, et appelées Internally Transcribed Spacer (ITS) (Jensen et al., 1993)

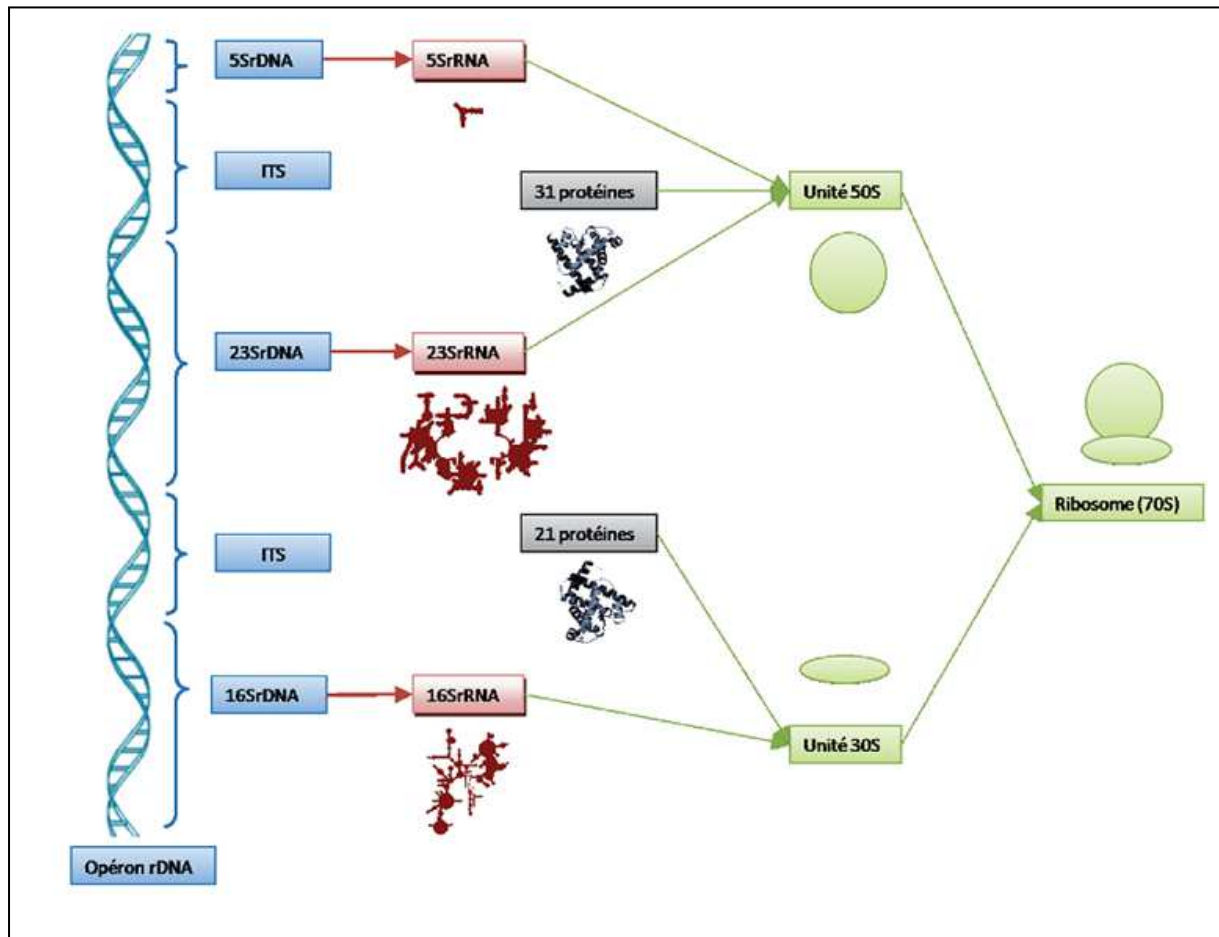


Figure 4. Composition du ribosome procaryote et de l'opéron ADNr. L'opéron rADN contient les séquences ADNr16S, ADNr23S et ADNr5S codant pour les ARN ribosomiques (ARNr16S, ARNr23S et ARNr5S) et 2 espaces intergéniques appelées ITS. Les protéines constituant les sous-unités du ribosome avec les ARN proviennent d'autres opérons du génome. (Huybens et al., 2009).

A l'intérieur de la même molécule d'ADN, il existe l'information nécessaire pour réaliser une classification à différents niveaux taxonomiques, du règne à l'espèce. Les zones variables permettent de distinguer des micro-organismes taxonomiquement proches tandis que les micro-organismes taxonomiquement éloignés sont regroupés grâce aux zones conservées. Il existe 9 zones hypervariables (de V1 à V9) (Baker et al., 2003) permettant la distinction de l'espèce (Van de Peer et al., 1996). Klijn et al. (1991) ont décrit 3 régions variables de l'ARNr 16S des bactéries lactiques (V1, V2 et V3). Pour les lactocoques, la région V1 est la plus variable, ce qui a permis la sélection de sondes spécifiques pour l'identification de ses espèces et sous espèces. Pour les leuconostocs, c'est la variabilité de la région V3 qui a permis de distinguer les espèces *mesenteroides*, *lactis* et

paramesenteroides. Le gène ADNr 23S est l'homologue du 16S pour la grande sous unité du ribosome. Il contient également des régions conservées et variables mais sa séquence générale est plus variable que celle du 16S (Van de Peer et al., 1996) et sa plus grande taille rend son séquençage plus long que le 16S. L'ARNr 5S ne s'utilise pas car l'information qu'il porte n'est pas suffisante pour identifier ou classer les bactéries. Beaucoup plus utilisés que l'ADNr 23Sr, les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (Internally Transcribed Spacer ou ITS) sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S). On utilise la région ITS pour discriminer par sondes (hybridation) ou amorces (PCR) les espèces dont les séquences ADNr 16S sont trop proches (exemple *Lb. plantarum* et *Lb. papraplantarum*) (Berthier & Ehrlich, 1998).

1.5.3. Identification au niveau espèce

1.5.3.1. Séquençage

Le séquençage consiste à connaître le nombre, la nature et l'ordre des nucléotides qui compose un génome ou une région d'un génome. Le gène de l'ADNr 16S est le gène le plus communément ciblé et séquencé dans l'étude de la diversité bactérienne. Le gène *rrs* codant l'ARNr 16S est amplifié par PCR en utilisant deux amorces dites universelles complémentaires des extrémités 5' et 3' conservées. Le produit d'amplification est ensuite séquencé. Il existe actuellement des séquenceurs semi-automatiques qui ont banalisé cette étape dans les laboratoires de biologie moléculaire. Pour chaque séquence obtenue, des séquences homologues sont recherchées dans des banques de données comme BMC Nucleic acid sequence (Randazzo et al., 2006), GenBank (Callon et al., 2004) via le réseau Internet à l'aide de programmes comme BLASTN du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou BIBI (Bio Informatic Bacterial Identification) (Whilhem et al., 2005). Le logiciel fournit un pourcentage d'homologie entre la séquence étudiée et celles contenues dans les banques de données. Dans l'étude des bactéries lactiques isolées de fromages, cette technique est souvent choisie en complément d'autres techniques de caractérisation génotypique afin de confirmer la classification générée par l'analyse des empreintes génétiques des bactéries. L'identification de certaines espèces de bactéries lactiques dans le Pecorino Siciliano (Randazzo et al., 2006) (Tableau 9), dans le fromage Salers Callon et al. (2004) et durant le procédé de fabrication de la Mozzarella (Morea et al., 1999) a ainsi été confirmée après regroupement de profils génotypiques générés respectivement par RFLP-PCR, Rep-PCR et RAPD-PCR. Cette technique est rapide mais demande un équipement spécifique et coûteux. Sa réalisation est donc souvent sous traitée à des plateformes ou laboratoires spécialisés, ce qui a rendu son accessibilité plus facile et meilleur marché. Toutefois, le séquençage du gène *rrs* de l'ARNr 16S n'est pas toujours suffisamment discriminant, c'est pourquoi des gènes alternatifs plus spécifiques d'espèces sont parfois amplifiés et séquencés, comme le gène

pheS codant pour la phénylalanine-ARNt synthétase pour confirmer l'identification des entérocoques au niveau de l'espèce (Jurkovič et al., 2006) (Tableau 9). De récentes approches d'identification basées sur le séquençage de plusieurs loci (Multi Locus Sequence Analysis or Typing : MLSA syn.MLST) (Figure 3) de 6 à 7 gènes répartis sur le chromosome bactérien (Maiden et al., 2006) ont été utilisés pour la discrimination de souches de *Lactococcus lactis* (Rademaker et al., 2007 ; Taibi et al., 2011 ; Turchi et al., 2013) mais leur usage est encore peu développé.

La fiabilité de l'identification des microorganismes au niveau genre ou espèce par séquençage dépend aussi grandement de la fiabilité des banques de référence qui sont alimentées par le dépôt de séquences associées à des identifications taxonomiques qui ne sont pas toujours contrôlées, ce qui est le cas des banques accessibles en ligne. Il est donc indispensable que chaque laboratoire s'assure de ce qu'il consulte pour se constituer une banque de références fiable (Berthier, communication personnelle).

1.5.3.2. PCR-spécifique

La connaissance des séquences des régions variables et conservées de l'ARNr 16S essentiellement, de l'ARN 23S et de l'ITS dans une moindre mesure, a conduit à la synthèse d'amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réalisation de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) qui vont servir à identifier les bactéries lactiques à différents niveaux taxonomiques, du genre à la sous-espèce. Le tableau 9 dresse une liste non exhaustive des amorces recensées pour les LAB et utilisées pour l'étude de l'écosystème fromage de brebis Ossau-Iraty. Le principe de la PCR est basé sur l'amplification de façon sélective d'une ou de plusieurs séquences d'ADN permettant l'identification exacte et rapide de la bactérie étudiée (Temmerman et al., 2004). L'amplification est réalisée grâce à une ADN polymérase et à un couple d'amorces qui va se fixer par complémentarité de part et d'autre de la séquence à amplifier, spécifique d'un taxon, dans des conditions contrôlées (Mullis et al., 1986). De nombreuses séquences d'ADN sont connues pour un grand nombre d'espèces de bactéries lactiques décrites. La présence de catalogue d'amorces spécifiques pour de nombreux taxons déterminés rend aujourd'hui possible et accessible l'identification des bactéries lactiques par PCR spécifique. Beaucoup d'amorces sont basées sur la séquence de régions de l'ADNr16S mais certaines sont aussi complémentaires de séquences codant pour d'autres gènes ou opérons d'intérêt. Par exemple, la séquence cible portée par le gène *tuf* ou le gène *ddl* (Domig et al., 2003) permet la détection et l'identification des entérocoques ; l'opéron responsable de la biosynthèse de l'histidine permet l'identification et la différenciation des sous-espèces *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ainsi que du biovar *diacetylactis* (Beimfohr et al., 1997) (Tableau10). La PCR-spécifique a

Tableau 9. Méthodes génotypiques utilisées pour identifier et/ou typer les bactéries lactiques(LAB) isolées de fromages traditionnels de brebis.

Fromages	Groupe/espèce étudié(e)	N isolats	Méthodes	Pouvoir discriminant	Référence
Canestrato Pugliese	LAB	33	RAPD-PCR	4 espèces 14 génotypes	Aquilanti et al., 2007
Pecorino Siciliano	LAB	498	PCR spécifique genre/espèce REA-PFGE	7 espèces - 2 genres 84 génotypes	Vernile et al., 2008
		66	RFLP ADNr16S Séquençage ADNr 16S	7 espèces	Randazzo et al., 2006
Pecorino Toscano	LAB	56	RAPD-PCR	7 espèces >17 génotypes	Bizzarro et al., 2000
Pecorino Sardo	LAB	543	PCR spécifique RAPD-PCR	7 espèces	Mannu et al., 2002
	Entérocoques	49	Profil plasmidique REA-PFGE	7 génotypes	Mannu et al., 1999
Fiore Sardo	Lactobacilles	457	PCR spécifique d'espèce	9 espèces	Mannu et al., 2000a
	Entérocoques	118	RAPD-PCR	3 espèces	Cosentino et al., 2004
Roncal	<i>Lactobacillus plantarum</i>	289	RADP-PCR	7 génotypes	Oneca et al., 2003
Idiazábal	Entérocoques	1154	PCR spécifique d'espèce Rep-PCR	6 espèces > 50 génotypes pour <i>Ec. faecalis</i>	Ortigosa et al., 2008
Manchego	Lactobacilles	197	RADP-PCR	6 espèces 42 génotypes	Sánchez et al., 2006
	Leuconostocs	23	RADP-PCR ARDRA	6 génotypes 3 espèces – 2 sous espèces	Nieto-Aribas et al., 2010
	Entérocoques	132	RADP-PCR PCR spécifique genre/espèce REA-PFGE	4 espèces 20 génotypes	Nieto-Aribas et al., 2011
Brindza	Entérocoques	308	PCR spécifique d'espèce Rep-PCR Séquençage du gène pheS	8 espèces	Jurkovič et al., 2006

servi à affirmer l'identité au niveau de l'espèce et de la sous espèce pour de nombreuses LAB isolées de lait et de fromages (Tableau 9). Cette identification peut intervenir sur des isolats représentatifs de profils génotypiques identiques afin de réduire le nombre de tests à réaliser (Tableau 9) ou en étape préalable à l'étude des caractéristiques phénotypiques d'une collection d'isolats (Mannu et al., 2002).

L'usage d'amorces dites spécifiques doit tenir compte des nouvelles espèces phylogénétiquement proches depuis la publication des amorces. De plus, lorsque la spécificité a été éprouvée, la spécificité d'amplification doit être testée dans les propres conditions du laboratoire.

Tableau 10. Exemples d'amorces utilisées pour l'identification des bactéries lactiques par amplification PCR-spécifique.

Amorces	Localisation	Séquence (5'→3')	Spécificité	Référence
16/16reverse	ADNr 16S	GCTGGATCACCTCCTTTC / GAAAGGAGGTGATCCAGC	<i>Eubactérie</i>	(0)
Lb1/Lb2	ADNr 16S	AGAGTTTGATCATGGCTACAG/ CGGTATTAGCATCTGTTTCC	<i>Lb. spp.</i>	(1)
Lbpl1 / Lbpl2	ADNr 16S	AATTGAGGCAGCTGGCCA/ GATTACGGGAGTCCAAGC	<i>Lb plantarum</i>	(2)
Lla / 27f	ADNr 16S	CAGTCGGTACAAGTACCAAC/ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>Lc lactis</i>	(3)
LLchis1F / LLchis2R	Opéron Histidine	GCGCTGAATTTACCTGAC/ TTCGCGCACCGCCGTC	<i>Lc lactis subsp</i>	(4)
LLhis3F / LLhis4R		AAAGAATTTTCAGAGAAA/ ATTAGAATTGGTTCAAC	<i>Lc lactis subsp lactis</i>	(4)
Lhis5F / Lhis6R		CTTCGTTATGATTTTACA/ AATATCAACAATTCCATG	<i>Lc lactis subsp lactis</i>	(4)
Lra / 27f	ADNr 16S	TGTCGAATATGCATCCAAC AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	<i>Lc raffinolactis</i>	(3)
ThI / ThII	ITS	ACGGAATGTACTTGAGTTTC / TTTGGCCTTTCGACCTAAC	<i>St thermophilus</i>	(2)

*BD : Biovar *diacetylactis*

(0) Berthier & Ehrlich, 1998 ; (1) Klijn et al., (1991) ; (2) Quere and al., (1997) ; (3) Barakat and al., (2000) ; (4) Beimfohr and al., (1997).

1.5.4. Diversité intra-espèce, suivi de souches

Le typage génétique des bactéries lactiques est basé sur l'analyse du polymorphisme du génome d'isolat. L'objectif des techniques associées est de produire une empreinte génétique de chaque isolat qui peut être interprétée comme un code barre et qui peut permettre d'identifier présomptivement du genre jusqu'à l'espèce et de tracer les souches dont sont issus ces isolats (Farber, 1996). Le pouvoir discriminant de ces méthodes permet généralement de différencier les isolats de bactéries lactiques jusqu'à la souche dont ils sont issus (Tableau 8). Le tableau 11 présente les techniques de typage qui ont été utilisées dans des travaux visant à caractériser des isolats de *Lc. lactis* de fromages de brebis. Quelle que soit la méthode de typage choisie, la révélation des empreintes ou profils génotypiques requiert l'utilisation d'une technique de séparation des produits du typage, l'électrophorèse. Deux types d'électrophorèse sont couramment utilisés : la première, classique, sur gel d'agarose qui permet la séparation de fragments d'ADN de taille inférieure à 50 kb et la deuxième, l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE pour des fragments d'ADN de taille supérieure à 50 kb. Seul le premier type est utilisé dans le cas des méthodes de typage génotypique utilisé dans ce travail.

Deux grands groupes de méthodes génotypiques sont utilisées pour le typage des bactéries lactiques : celles basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et celles basées sur la restriction enzymatique (REA) du génome. La combinaison des deux types de méthodes peut être exploitée. Les méthodes en REA ont été décrites par Randazzo et al. (2009). Leur pouvoir discriminant est élevé et permet de discriminer les LAB au niveau de la souche mais il est dépendant du type et du nombre d'enzymes de restriction utilisés. La simple séparation du matériel génétique par électrophorèse classique, après extraction, telle que l'analyse du profil plasmidique peut aussi être utilisée. Cette dernière méthode est rapide et facile à mettre en œuvre mais son inconvénient réside dans le fait que les souches peuvent gagner, perdre ou modifier les plasmides, que certains micro-organismes n'en possèdent pas et que des plasmides distincts peuvent avoir la même taille et ne pas être différenciés sur gel d'agarose (Farber et al., 1996).

Les méthodes basées sur la PCR reposent sur l'amplification de plusieurs régions de séquences inconnues dans le génome d'un isolat. Une ou plusieurs amorces sont utilisées par réaction PCR et les résultats de l'amplification par des jeux d'amorces différents (différentes réactions PCR) peuvent être combinés. L'avantage de cette technique réside dans le fait que les mêmes amorces peuvent être appliquées à un large nombre de microorganismes phylogénétiquement éloignés (bactéries Gram⁺ et Gram⁻ ; levures). Elles présentent les inconvénients de toute technique PCR (Li et al., 2009). La RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams, 1990) est la première technique de ce type à avoir été largement utilisée dans l'étude de la diversité des bactéries lactiques des écosystèmes

fromagers (Tableau 9). Sa faible reproductibilité et son faible pouvoir discriminant (Farber, 1996 ; Ben Amor et al., 2007; Berthier, communication personnelle) l'écarte des méthodes de choix pour la discrimination de souches d'une même espèce. Une seconde méthode de ce type, la Rep-PCR introduite pour les écosystèmes fromagers au début des années 2000 (Berthier et al., 2001), permet de supprimer les faiblesses de la RAPD. Le principe de la Rep-PCR, comme celui de la RAPD, est basé sur l'existence de séquences courtes d'ADN conservées qui se répètent et qui sont dispersées dans le génome de la plupart des bactéries (Versalovic et al., 1991). Cependant, alors que ces séquences ne sont pas connues pour la RAPD, obligeant à dessiner des amorces au hasard et courtes (12-15 bp), les séquences Rep sont connues et les amorces peuvent être plus longues, augmentant ainsi la reproductibilité des amplifications. Tobes & Ramos (2005) ont défini une séquence Rep (Repetitive Extra-genic Palindromic) comme étant : (i) extragénique, (ii), palindromique, (iii) d'une longueur de 21 à 65 bases et (iv) représentant plus de 0,5% de l'espace extragénique total. Les zones avec répétitions palindromiques extragéniques ou Rep séparent les zones codantes sur le génome des eubactéries (Stern et al., 1984). Le nombre et la localisation de ces séquences dans le génome sont propres à chaque espèce. De plus, les séquences présentes entre les éléments Rep peuvent être très variables au sein d'une même espèce, ce qui renforce le pouvoir discriminant de cette technique et permet de différencier des souches appartenant à une même espèce (Olive & Bean, 1999). Les séquences répétées les plus utilisées pour le typage des bactéries lactiques sont les éléments nommés REP, de 38 pb (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC, de 126 pb (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) et GTG₅, de 15 pb mais d'autres éléments répétés nommés BOX et LL-Rep1 ont été testés pour le typage de bactéries lactiques thermophiles (De Urraza et al., 2000) et *Lc. lactis* respectivement (Urbach et al., 1997). Cette technique est plus reproductible que la RAPD du fait que les amorces utilisées permettent une hybridation plus stable sur la séquence cible. L'ADN n'a pas besoin d'être purifié (Olive & Bean, 1999). La Rep-PCR montre un pouvoir discriminant supérieur à d'autres techniques basées sur l'analyse du génome (profils plasmidiques, restriction enzymatique de l'ARN 16S, ribotypage) (Olive & Bean, 1999) et présente une bonne corrélation avec la REA-PFGE (Olive & Bean, 1999) car les profils sont très informatifs.

Elle a été utilisée pour obtenir un criblage rapide des genres, espèces et/ou sous-espèces d'un large éventail de bactéries lactiques isolées de lait, de fromages ou de levains (Bendimerad et al., 2012 ; Berthier et al., 2001 ; Callon et al., 2004 ; Dalmaso et al., 2008 ; de Urraza et al., 2000 ; Ouadghiri et al., 2005 ; Terzic-Vidojevic et al., 2007 ; Zamfir et al., 2006) mais aussi plus spécifiquement de genres tels que *Lactobacillus* (Berthier et al., 2001 ; Gevers et al., 2001), *Enterococcus* (Ortigosa et al., 2008 ; Svec et al., 2005 ; Nikolic et al., 2008) et de l'espèce *Lc. lactis* (Casalta et al., 2005 ; Rademaker et al., 2007) (Tableau 9). Son application a permis de suivre la dynamique des souches de lactobacilles mésophiles durant la fabrication et l'affinage du Cheddar (Dasen et al., 2003) et de déterminer

l'origine des lactobacilles retrouvées dans le Comté (Berthier et al., 2001). Casalta et al. (2005) ont pu démontrer l'implantation de souches autochtones de *Lactococcus lactis* utilisées dans la fabrication du Venaco au lait cru et leur dynamique durant l'affinage du fromage (Tableau 11). La diversité interne des profils Rep-PCR des souches d'*Ec. faecalis* isolées du fromage Idiazabal a révélé que le fromager et le matériel de fabrication étaient les principes sources d'entérocoques retrouvés dans le fromage (Ortigosa et al., 2008).

1.4.5. Quantification

Dans le cas d'une approche culture-dépendante, les dénombrements directs sur milieux de culture sont classiquement utilisés pour quantifier une population (Figure 3). Le niveau taxonomique atteint est dépendant du niveau de sélectivité des milieux de culture utilisés mais il est limité au genre ou au groupe. En effet, les milieux utilisés classiquement pour le dénombrement des bactéries lactiques sont en nombre réduit et leur composition associée à leurs conditions d'incubation ont été mis au point de façon à cibler le développement sélectif des bactéries lactiques en fonction du genre ou de groupe auquel elles appartiennent : le milieu MSE (Mayeux Sandine Elliker), (Mayeux et al., 1962) pour les leuconostocs producteurs d'EPS, SB (Slanetz Bartley) (Slanetz et Bartley, 1957) pour les entérocoques, M17 pour les lactocoques et les streptocoques (Terzaghi & Sandine, 1975), MRS (Man Rogosa Sharpe agar) (De Man et al., 1960) pour les lactobacilles/pédiocoques/leuconostocs, FH (Facultativ Heterofermentativen Laktobazillen) (Isolini et al., 1990) pour le groupe des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LHF) par exemple. Excepté pour les milieux SB et FH (Callon et al., 2004), la faible sélectivité de ces milieux a été mise en évidence dans de nombreux travaux (Callon et al., 2004 ; Zamfir et al., 2006), ce qui rend peu fiable la quantification du genre ou groupe ciblé. Pour pallier cela, Depouilly et al. (2004) ont combiné les résultats obtenus lors de l'identification et le typage génotypique de bactéries isolées des milieux FH et MRS avec les dénombrements effectués à partir de ce même milieu pour pouvoir quantifier de façon juste les populations de chaque souche de lactobacilles identifiées dans le Comté. Ils ont ainsi pu montrer la dynamique d'espèces et de souches de lactobacilles dans ce fromage.

Tableau 11. Méthodes génotypiques utilisées pour identifier et typer des souches sauvages de *Lactococcus lactis* isolées de fromages traditionnels.

	N isolats	Méthodes	Pouvoir discriminant	Référence
Pecorino Sardo	29	Profil plasmidique	8 génotypes	Mannu et al., 2000b
		REA-PFGE		
		PCR spécifique genre/espèce		
Manchego	114	RADP-PCR	16 génotypes	Nieto-Aribas et al., 2009a
		PCR spécifique d'espèce	14 LL – 2 LC	
Venaco	88	RADP-PCR	33 génotypes	Gaya et al., 1999
			21 LL – 9 LC – 3 LD	
Batzos	40	Rep-PCR	Souches implantées	Casalta et al., 2005
		RADP-PCR		
Peñamellera	11	Profil plasmidique	9 génotypes	Sánchez et al., 2000
		RFLP-PFGE		
Afuega'l Pitu	22	Profil plasmidique	16 génotypes	Madera et al., 2003
		REA-PFGE		
Fromages espagnols	29	RADP-PCR	14 génotypes	Delgado et al., 2004
		RFLP-PFGE		
		ARDRA		
Pecorino	19	MLST	9 génotypes	Turchi et al., 2013

LL : *Lc. lactis* subsp. *lactis* ; LC: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ; LD : *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

2 - OBJECTIFS / OBJETIVOS

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'explorer la microflore lactique du fromage AOP Ossau-Iraty fermier tant en terme de biodiversité taxonomique et d'évolution des populations au cours du processus fromager que d'impact sur les qualités sensorielles des fromages lorsque des souches sauvages sont introduites dans le lait de fabrication. Ce travail se veut être un travail de défrichage d'une composante essentielle du microbiote de l'Ossau-Iraty sur lequel pourront s'appuyer de futures investigations et applications.

Pour cela, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

- 1-** décrire la biodiversité taxonomique et les dynamiques de croissance des bactéries lactiques, du genre à la souche, dans des fromages Ossau-Iraty fermiers élaborés avec du lait cru selon trois pratiques d'ensemencement de levains usuellement utilisés sur l'aire de production.
- 2-** évaluer les niveaux de *Lc. lactis* dans le lait cru produit sur l'aire géographique de l'Ossau-Iraty et explorer la diversité génotypique et le potentiel technologique de souches sauvages afin d'envisager leur utilisation dans la formulation d'un levain composé de souches sauvages autochtones.
- 3-** évaluer si l'utilisation d'un levain acidifiant composé de souches de *Lc. lactis* sauvages sélectionnées conduit à des caractéristiques comparables à celles de fromages Ossau-Iraty au lait cru fabriqués avec le levain commercial usuel, dans des conditions de fabrication non standardisées, dans des fermes de l'aire de production.

3 - METHODOLOGIE / METODOLOGÍA

Afin d'atteindre les trois objectifs définis auparavant, trois études complémentaires ont été réalisées. La figure 5 présente une vue globale des étapes et des liens entre les trois études. Les détails méthodologiques de chaque étape sont apportés dans les publications correspondantes (Chapitres 2 à 4).

L'étude 1 était structurée en 3 étapes. La première étape était une phase de prélèvements chez 5 producteurs fermiers de fromage l'Ossau-Iraty. Les pratiques de ces producteurs couvraient les pratiques d'ensemencement habituellement retrouvées chez les fermiers avec un ensemencement du lait de cuve soit avec des levains ou des combinaisons de levains commerciaux (S1, S1/S2) soit sans apport de levain. Cinq types d'échantillons ont été prélevés : le lait avant emprésurage selon la norme FILD-IDF 50C (1995), le caillé avant salage puis le fromage à 8, 120 et 180 jours d'affinage par sondage. Environ 2 cm de la partie extérieure de l'échantillon était retirée et remplacée à l'endroit prélevé afin de ne pas occasionner le développement de moisissure à l'intérieur. Les prélèvements étaient conservés à 4°C jusqu'à réception au laboratoire, généralement durant 24 heures. Les échantillons prélevés ont été analysés dès réception lors de la seconde étape. Les analyses réalisées ont consisté (i) à dénombrer et isoler des colonies bactériennes après ensemencement sur des milieux de culture habituellement utilisés pour les LAB, (ii) à sélectionner des LAB (Gram+/catalase -) et (iii) à déterminer leur profil génotypique par Rep-PCR, ce qui a permis de regrouper les profils identiques et ceux s'apparentant aux 49 souches de référence utilisées pour les comparaisons. Les souches des levains S1 et S2 ont été intégrées à la cette base de profils génotypiques en suivant la même procédure à partir de sachets de chaque levain sous forme lyophilysée. L'affiliation taxonomique des LAB de chaque regroupement a été confirmée par PCR spécifique de genre, d'espèce ou de sous espèce à partir de l'ADN d'un isolat représentatif du profil génotypique associé. La mise en parallèle de l'identité des LAB avec leur milieu de culture d'origine a permis de sélectionner les milieux les plus appropriés pour quantifier chacun des genres ou groupe de LAB (lactocoques, entérocoques, lactobacilles mésophiles, leuconotoc) et suivre leurs populations au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages étudiés. L'ensemble des souches utilisées dans l'étude a été conservé à -80°C durant toute la durée du travail.

L'étude 2 était structurée en 4 étapes. La première étape a consisté à prélever 32 laits crus de brebis servant à la fabrication de l'Ossau-Iraty. Afin de s'affranchir de la présence de souches de *Lc. lactis* commerciales potentiellement présentes dans l'environnement de fabrication de la ferme, les prélèvements ont eu lieu chez des producteurs-livreurs de laits pour lesquels aucune transformation fromagère n'a lieu et non chez des fermiers. Pour éviter l'effet potentiellement néfaste de la réfrigération, le lait a été prélevé juste après la traite du matin, acheminé au laboratoire et analysé.

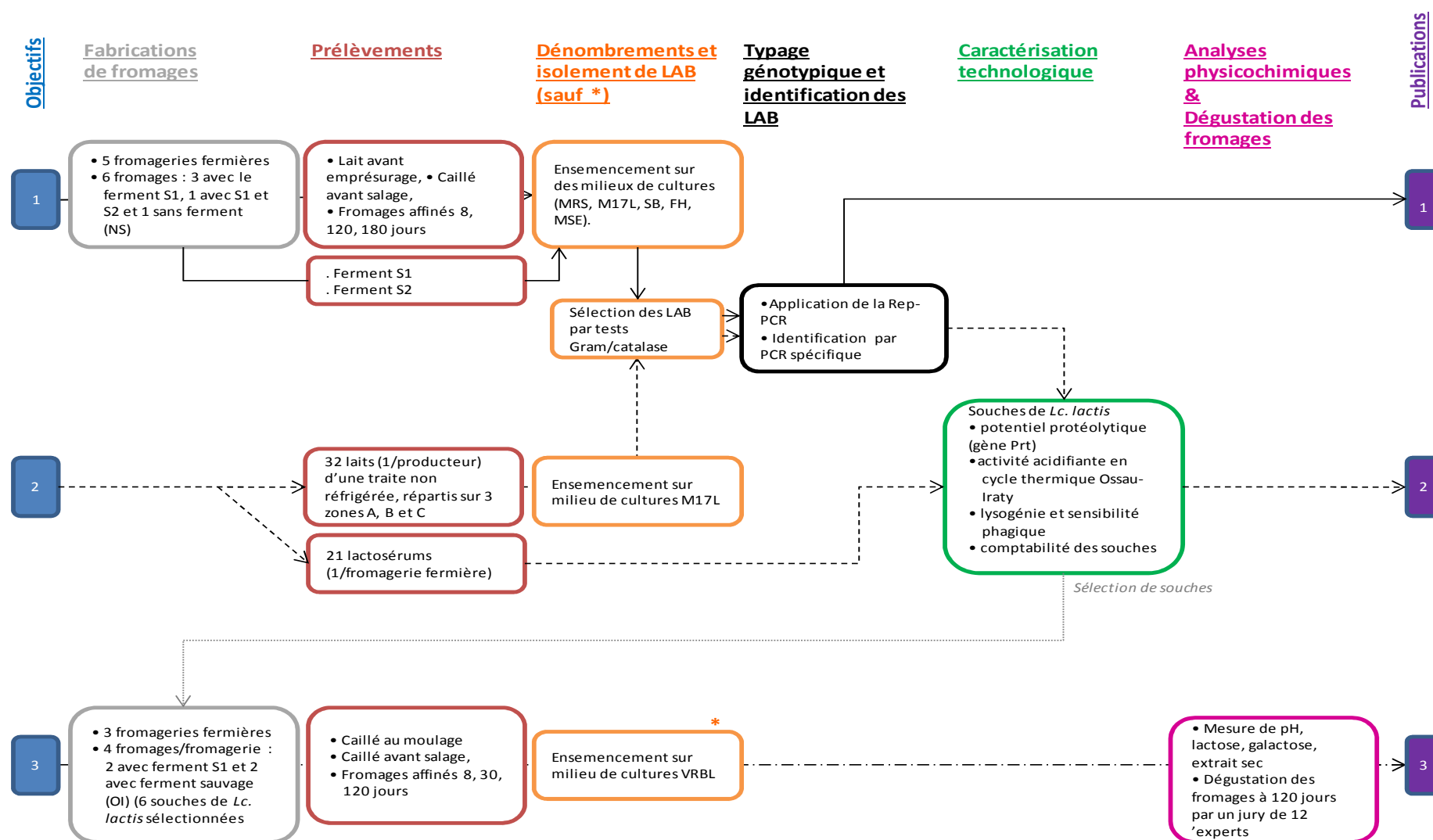


Figure 5. Schéma du procédé méthodologique global appliqué dans ce travail de thèse

Des lactosérums (21) ont été recueillis en parallèle dans 21 fromageries fermières à l'issue d'une fabrication d'Ossau-Iraty afin de constituer une banque de bactériophages destinée à être confrontée aux souches de *Lc. lactis* sauvages isolées pour déterminer leur sensibilité phagique. Cette banque de bactériophages locaux a été complétée par des phages de collection fournis par le laboratoire Christian Hansen (Danemark) et l'Université d'Oviedo (Espagne). La seconde et la troisième étapes étaient similaires à celles décrites dans la première étude excepté qu'un seul milieu de culture (M17L), usuel pour l'isolement de lactocoques, a été utilisé. Des souches commerciales de *Lc. lactis*, celles du levain S1 analysé dans la première étude et celles isolées du levain S3 (dans un travail réalisé en parallèle mais non décrit), utilisé par les fermiers lors des rotations pour prévenir les attaques phagiques. La troisième étape a permis de caractériser les souches de *Lc. lactis* sauvages au niveau technologique sur la base de 5 critères. Le potentiel protéolytique n'a pas été évalué par son expression mais détecté par la présence du gène de protéase de paroi. La présence de prophage a été mise en évidence par l'amplification PCR de l'ADN du phage P335, principalement impliqué dans le phénomène de lysogénie. Huit souches de *Lc. lactis* ont servi de référence dans cette étude.

L'étude 3 a permis de comparer les caractéristiques sanitaires, physicochimiques et sensorielles d'Ossau-Iraty fermiers élaborés avec un mélange (OI) de 6 souches sauvages de *Lc. lactis* décrites dans l'étude 2 avec celles de fromages fabriqués avec le levain S1 usuellement utilisé et décrit dans l'étude 1. Les fromageries fermières pour la réalisation de ces expérimentations ont été choisies sur la base du volontariat mais elles devaient remplir un certain nombre de critères dont le fait de maintenir une régularité dans leurs pratiques de fabrication, dans leur suivi sanitaire et dans la qualité sensorielle de leurs fromages. Elles devaient aussi répondre aux contraintes logistiques permettant de tester en parallèle le levain sauvage et le levain commercial. L'étude 3 a donc débuté par la mise en fabrication des fromages Ossau-Iraty dans les 3 fromageries choisies, à 2 reprises, avec chacun des 2 levains S1 et OI. Des prélèvements à plusieurs stades la fabrication et de l'affinage des fromages ont été réalisés afin de procéder aux analyses. L'évaluation de la qualité hygiénique des fromages a été évaluée par le dénombrement des coliformes (sur milieu VRBL), les modifications physico-chimiques par des mesures de pH, de lactose/galactose et d'extrait sec. Enfin, un jury de 12 experts a dégusté les fromages affinés à 120 jours et permis d'évaluer la conformité des fromages élaborés avec le levain sauvage OI avec les modèles de référence c'est à dire les fromages fabriqués avec le levain commercial S1. Cette évaluation a porté sur 4 critères majeurs de la dégustation d'Ossau-Iraty : l'odeur, la texture, le goût et l'arrière-goût qui ont été quantifiés sur une échelle de 1 (faible conformité) à 9 (forte conformité) selon la procédure habituelle de jugement des fromages Ossau-Iraty. Un travail de modélisation a été entrepris pour relier les scores des caractéristiques sensorielles obtenues et les paramètres technologiques employés.

CHAPITRE 2 /CAPITULO 2

Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses
made from raw ewe's milk with different starters

/

Biodiversité et dynamiques de croissance des bactéries lactiques dans les fromages
artisanaux AOP Ossau-Iraty au lait cru élaborés avec différents levains

/

Biodiversidad y dinámica de crecimiento de las bacterias lácticas en los quesos artesanales
de la DOP Ossau-Iraty elaborados con leche cruda y diferentes cultivos iniciadores

/

Bakterio laktikoen aniztasun biologikoa eta hazkunde dinamika Ossau-Iraty J.I.B (Jatorri
Izendapen Babestua) daukaten eta esne gordinarekin eta hainbat hartzigarrirekin egindako
artisautza-gaztetan.

Published in/Publié dans/Publicado en/ Plazaratu: *Food Microbiology* 29 (2012) 33-42.

Authors/Auteurs/Autores/Egileak: *Fabienne Feutry, Maria Oneca, Françoise Berthier, Paloma Torre.*

Indice d'impact de la revue

Food Microbiology

En accord avec les données du Journal Citation Reports (JCR) de 2012:

Facteur d'impact : 3,407

Classification dans la catégorie "Food Science & Technology": 8/123 (premier quartile)

Nombre de citations de la publication (15/06/2016) : 19

Contributions du doctorant

J'ai réalisé l'ensemble des étapes du travail expérimental. La mise en oeuvre des techniques basées sur la PCR a été facilitée par les démonstrations de Maria Oneca. J'ai effectué le traitement statistique des données et la rédaction de la publication. Celle-ci s'est faite sous la direction de Paloma Torre et en collaboration avec Françoise Berthier, co-auteur de cette publication.

Résumé

La biodiversité et les dynamiques de croissance des bactéries lactiques (LAB) issues de fromages fermiers Ossau-Iraty ont été explorées du lait de cuve mis en œuvre jusqu'au fromage affiné 180 jours. Six fabrications distinctes au lait cru ont été réalisées dans cinq fermes utilisant des méthodes fromagères traditionnelles. Le starter S1 a été utilisé pour trois fabrications, le starter S1 combiné au S2 pour une fabrication et aucun starter n'a été rajouté pour deux fabrications.

Jusqu'à dix espèces de LAB appartenant à cinq genres et jusqu'à 2 souches par espèce ont été identifiées par lait; jusqu'à 11 espèces appartenant à 5 genres et jusqu'à trois souches par espèces ont été identifiées par fromage. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* et *Leuconostoc mesenteroides* ont été détectés dans tous les fromages. Les lactocoques atteignaient les niveaux les plus élevés quel que soit le lait mis en fabrication et le starter utilisé. Les lactocoques et les entérocoques augmentaient durant la fabrication et les lactobacilles mésophiles augmentaient durant l'affinage. Le nombre de souche et d'espèces, le pourcentage des isolats provenant du lait cru, les dénombrements maxima de chaque genre/espèce et le moment où ils sont atteints, variaient selon l'utilisation ou non de starter mais aussi selon la composition du starter utilisé. Les génotypes des souches de même espèce variaient selon le lait cru utilisé. Des communautés distinctes de LAB étaient donc présentes durant la fabrication et l'affinage et devraient impacter les caractéristiques des fromages affinés.

Mots clés : Bactéries lactiques, Rep-PCR, PCR-spécifique, dynamique de croissance, fromage de brebis, lait cru.

Resumen

Se ha estudiado la biodiversidad y la dinámica del crecimiento de las bacterias lácticas (LAB) aisladas de quesos artesanales Ossau-Iraty elaborados en cinco granjas productoras de su propio queso, desde la leche de cuba hasta el queso de 180 días de maduración. Se realizaron seis fabricaciones distintas con leche cruda procedente de cinco granjas cada una de las cuales utilizó sus métodos habituales de elaboración. Se utilizó el cultivo iniciador S1 en tres fabricaciones, el S1 combinado con el S2 en otra y en las dos fabricaciones restantes no se añadió cultivo iniciador.

En cada leche, se identificaron hasta 10 especies de LAB pertenecientes a 5 géneros y hasta 2 cepas por especie. En cada queso, se identificaron hasta 11 especies de LAB pertenecientes a cinco géneros y hasta tres cepas por especie. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Leuconostoc mesenteroides* fueron aislados en todos los quesos. Los lactococos alcanzaron niveles más altos independientemente de su nivel en la leche inicial y del cultivo iniciador utilizado. Los lactococos y los enterococos aumentaron durante la fabricación y los lactobacilos mesófilos durante la maduración. El número de cepas y de especies, el porcentaje de cepas aisladas procedentes de la leche cruda, los recuentos máximos de cada género/especie y el momento en el que se alcanzaron, variaron según la composición del cultivo iniciador utilizado. Los genotipos de las cepas de la misma especie variaron según la leche cruda utilizada. Por todo ello, se comprueba la presencia de diferentes comunidades de LAB durante la fabricación y la maduración, lo que influirá sobre las características de los quesos maduros.

Palabras clave: Bacterias lácticas, Rep-PCR, PCR específica, dinámica de crecimiento, queso de oveja, leche cruda.

Laburpena

Ossau-Iraty artisautza-gaztetatik isolatutako bakterio laktikoen (LAB) biodibertsitatea eta hazkunde-dinamika ikertu dira. Gazta hauek beren gazta egiten duten bost baserritakoak ziren, eta baserriek gazta ekoizten dute kupela-esnetik gazta egin arte, 180 egunetako heldutasun-prozesuaren ondoren. Bost baserrietatik zetorren esne gordinarekin sei fabrikazio ezberdin egin ziren, eta baserri bakoitzak bere ohiko moduan egin zituen gaztak. S1 kultibo haslea hiru fabrikaziotan erabili zen, beste batean S1 kultibo haslea S2rekin nahasita, eta gainerako beste bi fabrikazioetan ez zen kultibo haslerik erabili.

Esne bakoitzean 10 LAB espezie identifikatu ziren, 5 generotakoak, eta 2 andui gehienez, espezieko. Gazta bakoitzean 11 LAB espezie identifikatu ziren, 5 generotakoak, eta 3 andui gehienez, espezieko. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Leuconostoc mesenteroides* gazta guztietan isolatu ziren. Laktokokoek maila handiagoak harrapatu zituzten, alde batera utzita hasierako esnean zeukaten kontzentrazioa eta erabilitako kultibo haslea. Laktokokoek eta enterokokoek kopurua handiagotu egin zen fabrikazioan zehar, eta laktobazilo mesofiloena heldze-prozesuan. Anduien eta espezieen kopurua, esne gordinetan isolatu ziren anduien ehunekoa, genero/espezie bakoitzaren zenbaketa maximoa eta hori noiz harrapatu zen, horiek denak erabilitako kultibo haslearen konposizioaren arabera aldatu ziren. Espezie bereko anduien genotipoak erabilitako esne gordinaren arabera aldatu ziren. Horregatik guztiagatik, egiaztatu egin da fabrikazioan eta heldze-prozesuan hainbat LAB komunitate dagoela, eta horrek gazta helduen ezaugarrietan eragiten du.

Gako hitzak: Bakterio laktikoak, Rep-PCR, PCR espezifikoa, hazkunde-dinamika, ardi gazta, esne gordina.



Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters

Fabienne Feutry^{a,*}, María Oneca^b, Françoise Berthier^c, Paloma Torre^b

^a Syndicat de défense de l'AOC Ossau-Iraty, 64120 Ostabat-Asme, France

^b Area de Nutrición y Bromatología, Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía s/n, 31006 Pamplona, Navarra, Spain

^c INRA, UR 342 Dairy Technology and Analysis, F-39800 Poligny, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2011

Received in revised form

27 July 2011

Accepted 7 August 2011

Available online 17 August 2011

Keywords:

Lactic acid bacteria

Rep-PCR

Specific PCR

Growth dynamic

Ewe's milk cheese

Raw milk

ABSTRACT

The biodiversity and growth dynamics of Lactic Acid Bacteria (LAB) in farm-house Ossau-Iraty cheeses were investigated from vat milk to 180 days of ripening in six independent batches made from six raw ewe's milks using five typical cheese-making methods. Commercial starter S1 was used for three batches, starter S1 combined with S2 for one batch and no starter for two batches.

Up to ten LAB species from five genera and up to two strains per species were identified per milk; up to eleven species from five genera and up to three strains per species were identified per cheese. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, and *Leuconostoc mesenteroides* were detected in all cheeses. Lactococci reached the highest counts irrespective of the milk and starter used. Lactococci and enterococci increased during manufacture, and mesophilic lactobacilli increased during ripening. Strain and species numbers, the percentage of isolates originating from the raw milk, maximum counts of each genus/species and time for reaching them, all varied according to whether or not a starter was used and the composition of the starter. The genotypes of strains within species varied according to the raw milk used. This generated distinct LAB microbiotas throughout manufacture and ripening that will certainly impact on the characteristics of the ripened cheeses.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor

* Corresponding author. Tel.: +33 559378661; fax: +33 559378104.

E-mail address: syndicat.ossau-iraty@wanadoo.fr (F. Feutry).

CHAPITRE 3 /CAPITULO 3

Lactococcus lactis strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese
area: levels, genotypic and technological diversity

/

Niveaux, diversité génotypique et technologique de souches de *Lactococcus lactis* isolées
d'échantillons de lait cru provenant de l'aire de production du fromage DOP Ossau-Iraty

/

Niveles, diversidad genética y tecnológica de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de
muestras de leche cruda producida en el área de producción del queso DOP Ossau-Iraty

/

Lactococcus lactis bakterioaren anduiak, Ossau-Iraty J.I.B gazten produkzio-eremuko esne-
laginetatik isolatuak: mailak eta aniztasun genotipiko eta teknologikoa

Published in/Publié dans/Publicado en/ Plazaratu: *Dairy Science & Technology*, 92 (2012) 655-670.

Authors/Auteurs/Autores/Egileak: *Fabienne Feutry, Paloma Torre, Ines Arana, Susana Garcia, Nathalie Desmasures, Erick Casalta*

Indice d'impact de la revue

Dairy Science and Technology

En accord avec les données du Journal Citation Reports (JCR) de 2012:

Facteur d'impact : 1,38

Classification dans la catégorie "Food Science & Technology": 53/124 (second quartile)

Nombre de citations de la publication (15/06/2016) : 2

Contributions du doctorant

J'ai réalisé les étapes du travail expérimental avec l'aide d'Ines Arana et de Susana Garcia, le traitement statistique des données et la rédaction de la publication. Cette dernière s'est faite sous la direction de Paloma Torre et avec la collaboration de Nathalie Desmasures et d'Erik Casalta, co-auteurs de la publication.

Résumé

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer les niveaux de *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) de laits de brebis produits dans trois régions de l'aire de production du fromage Ossau-Iraty, et d'étudier la diversité génotypique et technologique de ces souches sauvages afin d'envisager leur utilisation dans la formulation d'un starter autochtone. Trente-deux échantillons de lait provenant de 32 fermes ont été collectés. Les souches de *Lc. lactis* ont été identifiées et quantifiées en combinant l'utilisation de PCR spécifique d'espèce et de sous-espèce avec celle de la Rep-PCR. La diversité génotypique et technologique des souches sauvages a été comparée à celle de 12 souches commerciales. *Lc. lactis* a été détecté dans les échantillons de lait de seulement 20 fermes. Les niveaux détectés étaient inférieurs à $4 \log_{10}$ cfu mL⁻¹ dans 75% des laits. *Lc. lactis* subsp. *lactis* dominaient dans 66% des échantillons. Quarantetrois profils génotypiques de souches sauvages de *Lc. lactis* ont été mis en évidence et montraient une plus grande diversité que celle des souches commerciales. Les laits abritant *Lc. lactis* contenaient de une à quatre souches distinctes. À l'exception de deux souches, chaque souche n'était retrouvée que dans le lait d'une seule ferme. Les souches Prt + étaient les plus acidifiantes. La sensibilité aux phages collectés à partir de lactosérums différaient largement entre les souches commerciales (60%) et sauvages (5%). Les souches sauvages de *Lc. lactis* ont montré une grande diversité génotypique et technologique. La diversité génotypique semblait être liée à la ferme d'origine. Cette étude pose la question des facteurs environnementaux qui influencent une telle diversité naturelle. Une connaissance approfondie des propriétés technologiques souche-dépendante pourrait être utile dans la sélection de souches en prévision de l'élaboration de starter.

Mots clés : *Lactococcus lactis*; souche sauvage; diversité; technologique; génotypique; lait de brebis.

Resumen

Los objetivos de este trabajo han sido: (i) la cuantificación de los niveles de *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) presentes en la leche de oveja producida en tres áreas internas de la zona de producción del queso Ossau-Iraty y (ii) la evaluación de la diversidad genotípica y tecnológica de cepas aisladas de *Lc. lactis* para la posible elaboración de un cultivo iniciador. Se recogieron treinta y dos muestras de leche. Las cepas de *Lc. lactis* fueron identificadas y cuantificadas gracias al uso combinado de la PCR específica de especie y de sub-especie con la Rep-PCR. Se comparó la diversidad genotípica y tecnológica de las cepas autóctonas con la de 12 cepas comerciales. *Lc. lactis* fue detectada en muestras de leche de únicamente 20 granjas. Los niveles detectados fueron por debajo de $4 \log_{10}$ cfu mL⁻¹ en 75% de las leches. *Lc. lactis* subsp. *lactis* fue dominante en 66% de las muestras. Se identificaron 43 perfiles genotípicos de cepas autóctonas de *Lc. lactis* que mostraron una mayor diversidad que los de las cepas comerciales. Las leches que contuvieron *Lc. lactis* presentaron de una a cuatro cepas distintas. Excepto para dos cepas, cada cepa fue aislada de la leche de una sola granja. Las cepas P_{rt} + fueron las más acidificantes. La sensibilidad de las cepas autóctonas a los fagos colectados a partir de lactosueros se diferenció mucho entre las cepas comerciales (60%) y autóctonas (5%). Las cepas autóctonas de *Lc. lactis* han mostrado una gran diversidad genotípica y tecnológica. La diversidad genotípica apareció ligada a la granja de la cual procedía cada cepa. Este estudio suscita nuevas cuestiones relativas a los factores que podrían influenciar sobre tal biodiversidad. Un mayor conocimiento de las propiedades tecnológicas dependientes de cepa será muy útil para la selección de cepas a utilizar en la preparación de nuevos cultivos iniciadores.

Palabras clave: *Lactococcus lactis*; cepa autóctona; diversidad; tecnológico; genotípico; leche de oveja.

Laburpena

Hauek izan dira lanaren helburuak: (I) Ossau-Iraty gazta ekoizten den eremuko hiru barne-aldeetan ekoizten den ardi-esnean dauden *Lactococcus lactis-en* (*Lc. lactis*) mailak zenbatzea eta (ii) *Lc. lactis-en* andui isolatuen aniztasun genotipikoa eta teknologikoa ebaluatzea, kultibo hasle baten balizko prestakuntzarako. Hogeita hamabi esne lagin bildu ziren. *Lc. lactis-en* anduiak identifikatu eta zenbatu ziren espeziearen PCR espezifikoaren eta subespeziearen Rep-PCR delakoaren erabilera konbinatuari esker. Andui autoktonoen aniztasun genotipiko eta teknologikoa alderatu zen 12 andui komertzialen aniztasunarekin. *Lc. lactis* atzeman zen 20 baserritako esne-laginetan, bakarrik. Esneen % 75etan atzeman zen maila $4 \log_{10}$ cfu mL⁻¹ baino txikiagoa izan zen. *Lc. lactis*, *lactis* subespezia, nagusi izan zen laginen % 66tan. Andui komertzialek baino aniztasun handiagoa zeukaten *Lc. lactis-en* andui autoktonoen 43 profil genotipiko identifikatu ziren. *Lc. lactis* eduki zuten esneek andui bat eta lau andui ezberdinen artean eduki zituzten. Bi anduitarako izan ezik, andui bakoitza baserri bakar baten esnetik isolatu zen. Prt + anduiak izan ziren azidotzaileenak. Esne-gazuretatik abiatuak bildu ziren fagoekiko sentiberatasuna oso ezberdina izan zen andui komertzialen (% 60) eta autoktonoen (% 5) artean. *Lc. lactis-en* andui autoktonoek aniztasun genotipiko eta teknologiko handia erakutsi dute. Aniztasun genotipikoa andui bakoitzaren jatorria zen baserriari lotuta ageri zen. Azterketa honek galdera berriak sorrarazten ditu biodibertsitate horri eragiten ahalko lioketen faktoreei buruz. Anduiaren araberako ezaugarri teknologikoak hobeki ezagutzea oso komenigarria izango da kultibo hasle berriak prestatzeko zer andui erabili behar den aukeratzeko.

Gako-hitzak: *Lactococcus lactis*; andui autoktonoa; aniztasuna; teknologikoa; genotipikoa; ardi-esnea.

***Lactococcus lactis* strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity**

Fabienne Feutry • Paloma Torre • Ines Arana • Susana Garcia • Nathalie Desmasures • Erick Casalta

Received: 4 February 2012 / Revised: 8 July 2012 / Accepted: 16 July 2012 /
Published online: 30 August 2012
© INRA and Springer-Verlag, France 2012

Abstract The aims of this work were to assess the levels of *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) in ewe's milk produced in three Ossau-Iraty cheese sub-areas and to investigate the genotypic and technological diversity of isolated wild strains of *L. lactis* in order to assess their suitability for use as components of starter formulations. Thirty-two milk samples from 32 farms were collected. Strains of *L. lactis* were identified and quantified using a combination of species and subspecies-specific polymerase chain reaction (PCR) and PCR amplification of repetitive bacterial DNA elements (Rep-PCR). The genotypic and technological diversity of the indigenous strains was compared to that of 12 commercial strains. *L. lactis* was detected in milk samples from only 20 farms. The levels detected were below $4 \log_{10} \text{ cfu.mL}^{-1}$ in 75% of the milks. *L. lactis* subsp. *lactis* dominated in 66% of the samples. Forty-three genotypic profiles of wild *L. lactis* strains were detected and showed greater diversity than those of the commercial strains. Milks containing *L. lactis* contained one to four distinct strains. With the exception of two strains, each strain was found in milk from only one farm. The Prt⁺ strains were the most acidifying. Sensitivity to phages collected from wheys differed widely between the commercial (60%) and indigenous strains (5%). Wild strains of *L. lactis* displayed a wide genotypic and technological diversity. Genotypic diversity seemed to be linked to the farm of origin. This study addresses questions regarding the environmental factors which influence such natural diversity. A deeper knowledge of the strain-dependent technological properties would be useful in selecting strains for use in starter blends.

F. Feutry (✉)

Syndicat de défense de l'AOC Ossau-Iraty, 64120 Ostabat-Asme, France
e-mail: syndicat.ossau-iraty@wanadoo.fr

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor

CHAPITRE 4 /CAPITULO 4

Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses

/

Convenance d'un nouveau mélange de souches utilisé comme levain dans la fabrication de fromages non cuits au lait de brebis

/

Idoneidad de un nuevo cultivo iniciador mixto para la fabricación de quesos de oveja de leche cruda.

/

Starter misto berri baten egokitasuna esne gordineko ardi gaztak fabrikatzeko

Published in/Publié dans/Publicado en/ Plazaratu: *Food microbiology*, 56 (2016) 56-62.

Authors/Auteurs/Autores/Egileak: *Fabienne Feutry, Paloma Torre, Ines Arana, Susana Garcia, Francisco J. Pérez-Elortondo, Françoise Berthier.*

Indice d'impact de la revueFood Microbiology

En accord avec les données du Journal Citation Reports (JCR) de 2014:

Facteur d'impact : 3,331

Classification dans la catégorie "Food Science & Technology": 8/123 (premier quartile)

Nombre de citations de la publication (15/05/2016) : 0

Contribution du doctorant

J'ai réalisé l'ensemble des étapes du travail expérimental, la préparation des données pour le traitement statistique et rédactionnel. Le traitement statistique a été réalisé par Françoise Berthier à l'aide du logiciel Systat présent à l'INRA de Poligny. La rédaction de la publication s'est faite sous la direction de Paloma Torre et avec la collaboration de Françoise Berthier, co-auteur de la publication.

Résumé

La plupart des fromages Ossau-Iraty sont actuellement fabriqués à la ferme en utilisant le même levain acidifiant commercial(S1), composé de streptocoques et de lactocoques. Un des moyens d'augmenter leur diversité microbienne , qui est traditionnellement l'apanage de l'utilisation de lait cru pour fabriquer, c'est de formuler de nouveaux levains acidifiants combinant diverses souches caractérisées. Un nouveau levain acidifiant (OI) combinant 6 souches de lactocoques issues de lait cru, récemment isolées et caractérisées, a été testé en parallèle du levain acidifiant usuel lors de la fabrication de 12 fromages Ossau-Iraty au lait cru dans 3 fermes dans les conditions propres à chacune. La conformité des caractéristiques sensorielles avec celles attendues par les professionnels de l'Ossau-Iraty ainsi que les paramètres physicochimiques et les coliformes ont été quantifiés à des étapes-clés de la fabrication. Le nouveau starter OI a donné des fromages ayant une conformité sensorielle correcte mais moindre qu'avec les fromages S1 dans la plupart des conditions de fabrication tandis que les niveaux de coliformes étaient équivalents dans les fromages avec l'un et l'autre des levains. Cette moindre conformité sensorielle dépendait davantage de l'absence de *Streptococcus thermophilus* dans le levain OI que de la nature des souches de lactocoques présentes dans le levain OI. Cette étude montre aussi que les variations de 5 paramètres technologiques durant le premier jour de fabrication, dans la limite des valeurs appliquées dans les 3 fermes, sont des outils puissant pour diversifier les notes des caractéristiques sensorielles étudiées.

Mots clés : levain ; *Lactococcus lactis* ; *Streptococcus thermophilus* ; fromage au lait de brebis ; caractéristiques sensorielles ; conditions de fabrication.

Resumen

La mayor parte de los quesos artesanales Ossau-Iraty son elaborados en las granjas con un mismo fermento comercial compuesto por estreptococos y lactococos (S1). Una manera de aumentar la favorable diversidad microbiana que aporta la leche cruda para la elaboración de quesos, es diseñar nuevos fermentos combinando diversas cepas ya caracterizadas. Se ha comparado, frente al fermento S1, un nuevo fermento (OI) que combina 6 cepas caracterizadas de lactococos recientemente aisladas de leche cruda. Se han elaborado 12 quesos Ossau-Iraty en 3 granjas diferentes respetando las condiciones de fabricación propias de cada una. Se compararon en las etapas claves de la elaboración: los parámetros físico químicos, los niveles de coliformes y la conformidad de las características sensoriales obtenidas con las esperadas por los profesionales del Ossau-Iraty. La conformidad sensorial obtenida con el nuevo fermento OI fue correcta pero menor que aquella obtenida por los quesos S1 en la mayoría de las condiciones de fabricación mientras que los niveles de coliformes fueron similares con cualquier de los dos fermentos. Esta menor conformidad sensorial dependió más de la ausencia de *Streptococcus thermophilus* dentro del fermento OI que de las cepas de lactococos presentes dentro del fermento OI. Este estudio indicó también que las variaciones de 5 parámetros tecnológicos durante el primer día de elaboración, en el límite de los valores aplicados en cada granja, son herramientas poderosas para diversificar las notas de las características sensoriales estudiadas.

Palabras clave: cultivo iniciador; *Lactococcus lactis*; *Streptococcus thermophilus*; queso de oveja; características sensoriales; condiciones de fabricación.

Laburpena

Ossau-Iraty artisau-gazta gehienak baserrietan egiten dira eta egiteko, estreptokokoe eta laktokokoe osatutako hartzigarri komertzial bera erabiltzen da (S1). Esne gordinak gaztak egiteko ematen duen mikrobioen aniztasun mesedegarria handiagotzeko modu bat izaten da hartzigarri berriak diseinatzea, hainbat andui karakterizatu nahasiz. S1 hartzigarria berriki esne gordinetik isolatu diren laktokokoen 6 andui karakterizatiarekin beste hartzigarri berri batekin (OI) alderatu da. 12 Ossau-Iratyko gazta egin dira 3 baserritan, baserri bakoitzaren fabrikazio-moldeak errespetatuz. Ezaugarri hauek alderatu ziren prestakuntzaren une garrantzizkoenetan: parametro fisiko-kimikoak, koliformeen mailak eta lortu ziren ezaugarri sentzorialak profesionalek Ossau-Iratyko gazta batetik espero dezaketenekin bat zetozen edo ez. OI hartzigarri berriarekin lortu zen adostasun sentzoriala ona izan zen, baina S1 hartzigarriarekin egindako gaztek lortu zutena baino txikiagoa fabrikazio-baldintza gehienetan; bitartean, koliformeen mailak antzekoak izan ziren bi hartzigarriekin. Adostasun sentzorial txikiago honek zerikusi gehiago du OI hartzigarriak *Streptococcus thermophilus* ez edukitzearekin, dauzkan laktokokoen anduiak edukitzearekin baino. Azterketa honek erakutsi zuen, halaber, lehen prestakuntza-egunean 5 parametro aldatzea, baserri bakoitzak aplikatzen dituen balioen muga, tresna eraginkorra dela aztertutako ezaugarri sentzorialak dibertsifikatzeko.

Gako hitzak: hartzigarri; *Lactococcus lactis*; *Streptococcus thermophilus*; ardi gazta; ezaugarri sentzorialak; fabrikazio-baldintzak



Suitability of a new mixed-strain starter for manufacturing uncooked raw ewe's milk cheeses



Fabienne Feutry^{a,*}, Paloma Torre^b, Ines Arana^b, Susana Garcia^b,
Francisco J. Pérez Elortondo^c, Françoise Berthier^d

^a Syndicat de défense de l'AOC Ossau-Iraty, 64120, Ostabat-Asme, France

^b Area de Nutrición y Bromatología, Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadia s/n, 31006, Pamplona, Spain

^c Laboratorio de Análisis Sensorial Euskal Herriko Unibertsitatea (LASEHU), Department of Pharmacy and Food sciences, Lascaray Research Center, Universidad del País Vasco, 3, 01006, Vitoria-Gasteiz, Spain

^d INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières, F-39801, Poligny, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2015

Received in revised form

6 December 2015

Accepted 11 December 2015

Available online 19 December 2015

Keywords:

Starter

Lactococcus lactis

Streptococcus thermophilus

Ewe's raw milk cheese

Sensory characteristics

Manufacturing conditions

ABSTRACT

Most raw milk Ossau-Iraty cheeses are currently manufactured on-farm using the same commercial streptococcal-lactococcal starter (S1). One way to enhance the microbial diversity that gives raw milk its advantages for cheese-making is to formulate new starters combining diverse, characterized strains. A new starter (OI) combining 6 raw milk strains of lactococci, recently isolated and characterized, was tested in parallel with the current starter by making 12 Ossau-Iraty raw milk cheeses at 3 farmhouses under the conditions prevailing at each farm. Compliance of the sensory characteristics with those expected by the Ossau-Iraty professionals, physicochemical parameters and coliforms were quantified at key manufacturing steps. The new starter OI gave cheeses having proper compliance but having lower compliance than the S1 cheeses under most manufacturing conditions, while managing coliform levels equally well as starter S1. This lower compliance relied more on the absence of *Streptococcus thermophilus* in starter OI, than on the nature of the lactococcal strains present in starter OI. The study also shows that variations in 5 technological parameters during the first day of manufacture, within the range of values applied in the 3 farmhouses, are powerful tools for diversifying the scores for the sensory characteristics investigated.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor

* Corresponding author.

E-mail address: fabienne.feutry@educagri.fr (F. Feutry).

CHAPITRE 5 /CAPITULO 5

CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

PERSPECTIVES / PERSPECTIVAS

1 - CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

Depuis l'ère de la microbiologie pasteurienne jusqu'à l'utilisation, de nos jours, du séquençage à haut débit, l'exploration du microbiote des fromages traditionnels a généré et continue de générer de nombreuses données sur de nombreuses variétés de fromages fabriqués à partir de laits d'espèces animales différentes. Toutefois, jusqu'à présent, aucune étude n'avait été réalisée sur les populations microbiennes de l'AOP Ossau-Iraty.

1 - A propos de la biodiversité et de la dynamique des LAB dans les fromages Ossau-Iraty fermiers fabriqués avec différents types de levains lactiques acidifiants :

1.1 - Le lait cru est une source irremplaçable et principale de diversité taxonomique microbienne dans le fromage Ossau-Iraty mature fermier : entre 44% et 100% des souches de LAB isolées dans les fromages en fin d'affinage proviennent du lait cru mis en fabrication.

1.2 - Chaque fromage s'est révélé être un écosystème unique malgré la présence d'espèces communes (*Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, *Ec. faecalis*, *Ec. faecium*, *Ec. durans*, *Ln. mesenteroides*) et la similarité des dynamiques des principaux groupes de bactéries lactiques durant la fabrication et l'affinage des fromages. La singularité de chaque fromage réside dans (i) la présence de souches différentes, (ii) des équilibres différents entre les différents groupes de bactéries lactiques et entre les espèces appartenant à un même genre, (iii) des niveaux maximum différents atteints par chaque espèce.

2 - A propos de l'état qualitatif et quantitatif, et de la diversité génotypique et technologique des populations de *Lc. lactis* dans les laits crus de brebis pour la fabrication d'Ossau-Iraty :

2.1 - La présence de *Lc. lactis* a été détectée dans les laits de brebis ayant des niveaux supérieurs ou égaux à 80 *Lc. lactis* /mL de lait. Les niveaux de *Lc. lactis* pouvaient être multipliés jusqu'à 1000 selon le lait de brebis analysé. Le génotype *Lc. lactis*. subsp. *lactis* a été majoritairement retrouvé. De 1 à 4 souches de *Lc. lactis* ont été détectées par lait analysé

2.2 - Les *Lc. lactis* sauvages des laits de brebis présentent une grande diversité de profils génotypiques (43 profils). Ils se distinguent des *Lc. lactis* commerciaux présents dans les levains acidifiants communément utilisés par leurs profils génotypiques ; les profils génotypiques étaient différents entre fermes.

2.3 - Technologiquement, les souches sauvages de *Lc. lactis* constituent un réel intérêt pour la fabrication de l'Ossau-Iraty notamment (i) par leur résistance aux phages locaux (95% de souches résistantes), ce qui les distingue principalement des souches commerciales (40% de souches résistantes).

3 - A propos de la pertinence de l'utilisation d'un mélange de souches sauvages de *Lc. lactis* pour la fabrication d'Ossau-Iraty au lait cru dans les fermes :

3.1 - Le levain acidifiant sauvage a conduit à la fabrication de fromages répondant aux exigences sensorielles et hygiéniques conformément aux exigences attendues pour l'agrément du fromage Ossau-Iraty mais les scores obtenus au niveau de la texture, du goût, et de l'arrière-goût étaient plus bas que ceux obtenus avec le levain commercial S1, dans les conditions de fabrication appliquées.

3.2 - La moindre conformité des fromages fabriqués avec le levain sauvage est davantage due à l'absence de *St. thermophilus* dans le levain sauvage qu'à la nature des lactococoques présents.

3.3 - Même si l'effet "levain acidifiant" est prépondérant sur la variabilité des scores sensoriels obtenus, la modulation de certains paramètres technologiques - comme la température d'inoculation des levains, la température de chauffage du caillé- intervenant durant les premières étapes de la fabrication permet néanmoins de faire varier les scores des 4 critères faisant l'objet de l'analyse sensorielle dans la filière Ossau-Iraty, à levain identique.

2 - PERSPECTIVES / PERSPECTIVAS

Parmi les perspectives envisageables, trois voies d'investigations complémentaires pourraient être développées : deux à caractère plutôt technologique dont les finalités seraient plus spécifiquement destinées aux fromagers et/ou aux techniciens d'élevage en charge de production au lait cru ; une autre, plus englobante, qui s'inscrit, dans la durée, dans une démarche de compréhension et d'action pour le développement territorial local à travers ses produits de terroir.

1 – Voie 1 : mettre au point des levains sélectionnés

1.1 - Tester de nouveaux levains acidifiants composés à la fois de souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactococcus lactis* sauvages pour confirmer les résultats observés dans la troisième étude de ce travail de thèse et mimer au plus près le levain acidifiant commercial couramment utilisé en fabrication fermière.

L'approche expérimentale développée lors de la troisième étude de ce travail de thèse pourrait être utilisée, en particulier, pour fabriquer dans les conditions réelles prévalant dans des ateliers de fabrication. Cependant, il faudrait avoir connaissance, au préalable, de la représentativité de cette espèce de LAB dans les laits Ossau-Iraty. Cette voie de développement nécessiterait en effet une phase d'exploration des populations de *Streptococcus thermophilus* dans les laits crus de brebis de la zone de production Ossau-Iraty, tant en terme de quantité que de diversité génotypique et technologique tel que cela a été entrepris pour la population de *Lc. lactis*. Une comparaison avec les souches *Streptococcus thermophilus* commerciales présentes dans les levains acidifiants commerciaux testés pourrait être faite dans un premier temps.

1.2 - Explorer des caractéristiques phénotypiques d'autres espèces de LAB mises en collection pour envisager leur introduction dans des levains d'affinage par exemple l'étude des espèces de lactobacilles mésophiles, génotypiquement très diversifiées puisqu'elles représentent, dans cette étude, près de 30% des 62 génotypes affiliés à d'autres espèces que celle des lactocoques. Une association de souches NSLAB avec des souches lactocoques pourraient alors être envisagée si la demande était exprimée par les professionnels.

1.3 - Optimiser le milieu de repiquage des souches sauvages sélectionnées pour préserver les caractéristiques phénotypiques des souches sauvages sélectionnées au fil des repiquages successifs. Si on prend le cas de l'espèce *Lactococcus lactis*, pour qui l'habitat originel est végétal, il a été montré que lorsque ces souches non laitières se retrouvent dans le lait, elles y trouvent un milieu stable, nutritivement riche, moins compétitif, dans lequel une sélection artificielle conduirait à l'optimisation du génome des souches et à une spécialisation qui les rendrait ensuite incapable de survivre dans

leur milieu d'origine après un repiquage routinier dans du lait. Une expérimentation menée par [Bachman et al. \(2012\)](#), a montré la vitesse à laquelle se fait cette spécialisation : après seulement 1000 générations dans du lait d'une souche isolée de végétaux, les auteurs ont observé une augmentation de la vitesse de croissance, de l'activité acidifiante et des transcriptomes similaires à ceux de souches laitières de *Lc. lactis*. Le risque de voir disparaître les caractéristiques particulières pour lesquelles les souches ont été sélectionnées à mesure des repiquages dans un milieu simplifié par rapport à leur milieu d'origine est donc bien réel. Pour pallier les méfaits de cette domestication, [Cavanagh et al. \(2015\)](#) proposent de réaliser les cultures des souches sauvages dans un milieu dont la composition serait minimale avant leur culture dans du lait et leur inoculation dans les cuves de fabrication des fromages. Ces données montrent que le maintien des propriétés originelles des souches sauvages réside dans le maintien des conditions naturelles du milieu d'origine. Elles montrent aussi que, dans des conditions de repiquage standard, dans un milieu simplifié comme le lait traité thermiquement, la sélection de souches sauvages est un travail perpétuel.

2 – Voie 2 : poursuivre la recherche des sources de la diversité microbienne des laits crus de brebis

L'utilisation de levains sauvages sélectionnés est une option pour les fromagers pour apporter de la diversité microbienne à leurs fromages mais, comme discuté en 1.3, cette pratique demanderait une sélection perpétuelle de nouvelles souches sauvages. Étant donné que le lait cru reste une source indéniable de cette diversité, il paraît primordial d'étudier les sources (environnement de la ferme et pratiques associées d'élevage, de traite, de stockage du lait) en amont de la transformation du lait en cuve, c'est à dire du champ à la cuve de fabrication, qui favoriseraient la présence et la préservation des souches de LAB présentes dans le lait cru et plus généralement des microorganismes d'intérêt technologique. Des réflexions et des travaux ont été menés depuis quelques années, en particulier dans la zone Ossau Iraty, afin d'identifier les réservoirs potentiellement hébergeurs de microorganismes d'intérêt technologique dans des exploitations produisant du lait de brebis pour la fabrication d'Ossau-Iraty ([Feutry, 2012](#) ; [Monsalier et al., 2014](#)) et les résultats obtenus montrent que la peau des trayons, la surface de couchage des brebis, l'air environnant la traite et la machine à traire, méritent des investigations plus poussées de par la charge de microorganismes d'intérêt technologique qu'ils abritent. Les pratiques de stockage et de transport du lait en fromagerie sont aussi des étapes qui demandent à être exploré pour comprendre les flux de microorganismes jusqu'aux laits de cuve mis en fabrication. La connaissance des réservoirs et des flux pourraient alimenter des outils d'aide à la décision auprès des techniciens d'élevage, des personnes en charge de la qualité au sein de la filière, pour orienter les pratiques au sein des exploitations.

3 – Voie 3 : Explorer des composantes des fromages Ossau Iraty autres que la diversité microbienne des fromages Ossau-Iraty

Le fromage Ossau-Iraty est une des 25 AOP fromagères européennes au lait entier de brebis. Par définition, un produit AOP n'est pas délocalisable puisque sa production ne peut se faire en dehors de la zone géographique qui a été définie dans le cahier des charges. Au travers des notions de terroir, de typicité, chaque AOP défend donc une spécificité qu'elle doit justifier. Pour cela, si on considère le produit final comme la résultante de composantes multiples en interactions, il serait nécessaire d'appréhender le produit dans une approche globale, d'associer les dimensions culturelle, patrimoniale, sociale, économique, géographique à celles qui sont liées à la matière et à ses microorganismes.

Ce travail s'est intéressé à la composante microbiologique en fournissant une description partielle du microbiote de l'Ossau-Iraty, en détaillant sa composante LAB mais cette description demanderait à être étoffée et confortée par l'analyse de fromages supplémentaires et des populations autres que LAB dans la pâte et dans la croûte. Cette perspective devrait être appréhendée dans le but de comprendre l'influence des pratiques fromagères sur les interactions entre le microbiote et la composition physico-chimique du fromage intervenant dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles de l'Ossau-Iraty. Elle devra elle-même être construite sur la base de coopérations multidisciplinaires.

A

- Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A. & Gobbetti, M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology* 67, 35–48.
- Alegria, Á., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski J. & Kowalczyk, M., 2012. Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and –Independent Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78,1890-1898.
- Alegria, Á., Delgado, S., Flórez, A.B. & Mayo, B., 2013. Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science and Technology*, 93, 657-673.
- Aquilanti, L., Dell'Aquila, L., Zannini, E., Zocchetti, A. & Clementi, F., 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 61–67.
- Arana, I., 2001. El género *Enterococcus* en la maduración del queso Idiazábal. Identificación y caracterización tecnológica de cepas para la elaboración de un cultivo iniciador autóctono. Thesis. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. Spain.
- Arizcun, C., 1995. Caracterización microbiológica de los quesos con Denominación de Origen Roncal e Idiazábal elaborados en Navarra. Thesis. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. Spain.
- Arizcun, C., Barcina, Y., & Torre, P., 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 17-24.
- Awad, S., Hassan, A.N. & Muthukumarappan, M., 2005. Application of Exopolysaccharide-Producing Cultures in Reduced-Fat Cheddar cheese: Texture and Melting Properties. *Journal of Dairy Science*, 88, 4204-4213.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M. & Smit, G., 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal* 9, 725-735.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. & Smit, G., 2000. Application of wild starter cultures for flavor development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal* 10, 169-179.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. & Smit, G., 2002. Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal* 12, 145-150.

B

- Bachmann, H., Starrenburg, M.J., Molenaar, D., Kleerebezem, M. & van Hylckama Vlieg, J.E., 2012. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research*, 22, 115-124.
- Baker, G.C., Smith, J.J. & Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 541-555.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W. & Harris, L.J., 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 83-94.
- Beimfohr, C., Ludwig, W. & Schleifer K.H., 1997. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 216-221.
- Bendimerad, N., Kihal, M., & Berthier, F., 2012. Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science and Technology*, 92, 249-264.
- Ben Amor, K., Vaughan, E. & de Vos, W.M., 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition*, 137, 741S-747S.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. & Cogan, T. M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

- Bernardeau, M., Gueguen, M. & Vernoux, J.P., 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 487–513.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. & Guéguen, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278-285.
- Berthier, F. & Ehrlich, S.D., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 97-106.
- Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., & Grappin R., 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*, 11, 293-305.
- Bertozzi, L. & Panari, G., 1993. Cheeses with Appellation d’Origine Contrôlée (AOC): factors that affect quality. *International Dairy Journal* 3, 297-312.
- Bizzarro, R., Tarelli, G.T., Giraffa, G. & Neviani, E., 2000. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Pecorino Toscano cheese. *Italian Journal Food Science*, 12, 303–316.
- Bonomo, M.G & Salzano, G., 2013. Genotypic and technological diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strains for use as adjunct starter cultures in Pecorino di Filiano cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 402-409.
- Broome, M.C., Krause, D.A., Hickey, M.W., 1990 The use of non-starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 67-73.
- Buchbinder, L., Baris, Y., Alif, E., Reynolds, E., Dillon, E., Pessin, V., Pincus, L. & Strauss, A., 1951. Studies to formulate new media for the standard plate count of dairy products. *Public Health Reports*, 66, 327-340.

C

- Callon, C., Millet, L. & Montel, M.C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71, 231-244.
- Callon, C. & Montel, M.C., 2011. Chap 1-3: Comment apprécier les écosystèmes microbiens du lait ? In: *Microflore du lait cru - RMT « Filières fromagères valorisant leur terroir »*. Laithier, C., Technipel (Ed), Paris.
- Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanto, D.J., Fornasari, M.E., Reinheimer, J.A. & Guglielmotti, D.M., 2011. Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science and Technology*, 91, 457-470.
- Caridi, A., 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 105-110.
- Casalta E., Vassal, Y., Desmazeaud, M.J. & Casabianca, F., 1995. Comparaison de l’activité acidifiante des souches de *Lactococcus lactis* isolées de lait et de fromages de Corse. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 291-299.
- Casalta, E. & Zennaro, R., 1997. Effects of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. *Sciences des Aliments*, 17, 79-94.
- Casalta, E., Noël, Y., Le Bars, D., Carré, C., Achilleos, C. & Maroselli, M.X., 2001. Caractérisation du fromage Bastelicaccia. *Lait*, 81, 529-546.
- Casalta, E., 2003. Maîtrise de la qualité du Venaco, un fromage au lait cru. Bases scientifiques pour la mise au point de levains sélectionnés. Thèse de doctorat de l’université de Dijon, France. 106 p.
- Casalta, E., Cachena, J.M., Aubert, C., Dufrene, F., Noël, Y. & Beuvier, E., 2005. Application of specific starters for the manufacture of Venaco cheese. *Lait*, 85, 205-222.
- Casalta, E. & Montel, M.C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 271–273.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G.F. & McAuliffe, O., 2015. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45-61.

- Centeno, J.A., Tomillo, F.J., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P. & Nuñez, M., 2002. Effect of Wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 3164-3172.
- Champagne, C.P., Gagnon, D., St-Gelais, D. & Vuillemand, J.C., 2009. Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. *International Dairy Journal*, 19, 669-674.
- Cibik, R., Lepage, E., & Tailliez, P., 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Systematic Applied Microbiology*, 23, 267-278.
- Coda, R., Brechany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2006. Comparison of the compositional, microbiological biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian Ewes' milk cheeses. *Journal of Dairy Science*, 89, 4126-4143.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. & Rodriguez, E., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Cosentino, S., Pisano, M.B., Corda, A., Fadda, M.E. & Piras, C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Journal of Dairy Research*, 71, 444-450.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R. & Pisano, M.B., 2012. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-8.
- Costa, N., Hannon, J., Guine, T., Auty, M., McSweeney, P. & Beresford, T., 2010. Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 93, 3469-3486.

D

- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T. & Cocolin, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *Food Science and Technology*, 43, 1151-1159.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. R. & Gobbetti, M., 2001. Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Italian Ewe Cheeses Based on Phenotypic, Genotypic, and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2011-2020.
- De Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- De Urraza, P.J., Gomez-Zavaglia, A., Lozano, M.E., Romaniwski, V. & De Antoni, G.L., 2000. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Research*, 67, 381-392.
- Dalmaso, M., Prestoz, S., Rigobello, V. & Demarigny, Y., 2008. Evolution of the raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12 days milking regime. *International Journal of Dairy Science*, 3, 117-130.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A.G. & Banks, J., 2003. Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurized milk. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 595-607.
- Delgado, S., Delgado T. & Mayo, B., 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *Journal of Food Protection*, 65, 1590-1596.
- Depouilly, A., Dufrene, F., Beuvier, E. & Berthier, F., 2004. Genotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait*, 84, 155-167.
- Delorme, C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 274-277.

- Devoyod, J.J., Bret, G. & Auclair, J.E., 1968. La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage. *Lait*, 478, 613-629.
- Devoyod, J.J., 1969. La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV.- Les entérocoques. *Lait*, 489, 637-650
- Devoyod, J.J., 1970. La flore microbienne du fromage de Roquefort. V.- Les lactobacilles. *Lait*, 495, 277-284.
- Devoyod, J.J. & Poullain, F., 1988. Les *Leuconostocs* : propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68, 249-280.
- Di Cagno, R., Banks, J., Sheenan, L., Fox, P.F., Brechany, E.Y., Corsetti, A. & Gobetti, M., 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewe's milk cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 961-972.
- Domig, K. J., Mayer, H. K. & Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 165-188.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861-870.

E

- Elsborg, K., 1997. Cheese cultures adapted to specific technologies. *European Dairy Magazine*, 9, 44-45.

F

- Farber, J.M., 1996. An introduction to Hows and Whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, 59, 1091-1101.
- Fernández del Pozo, B.S., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A. & Nuñez, M., 1989. El queso de la Serena: tecnología, química; reología y microbiología. *Revista española de Lechería*, 10, 32-34.
- Feutry, F., 2012. Les flores microbiennes des surfaces de couchage et des trayons de brebis laitières. Présentation affichée, Colloque 3R, 5-6 décembre 2012, Paris.
- Forde, A. & Fitzgerald, G.F., 2003. Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pC1658. *Plasmid*, 49, 130-142.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. & Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. & Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. & Galvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 125-140.
- Freitas, C. & Malcata, F.J., 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 584-602.

G

- Garde, S., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M., 1997. Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters*, 19, 1011-1014.
- Gaya, P., Babín, M., Medina, M. & Nuñez, M., 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 849-855.
- Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetakis, N., 2003. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *International Journal of Dairy Technology* 56, 117-122.

- Gevers, D., Huys, G. & Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiology Letters, 205, 31-36.
- Gibbons, J.C. & Rinker, D.C., 2015. The genomics of microbial domestication in levained food environment. Current Opinion in Genetics and Environment, 35, 1-8.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88, 215-222.
- Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. FEMS Microbiology, 28, 251-260.
- Gomez, M.J., Rodriguez, E., Gaya, P., Nuñez, M. & Medina, M., 1999. Characteristics of Manchego cheese from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. Journal of Dairy Science, 82, 2300-2307.
- González, J., Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Rebollo, J.E. & Cáceres, P., 2003. Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibore goat's milk cheeses. Lait, 83, 193-202.
- González, L. & Zárate, V., 2012. Influence of an autochthonous starter cultura and a commercial starter on the characteristics of Tenerife pasteurized goat's milk cheese. International Journal of Dairy Technology, 65, 542-547.
- Govaris, A. & Moatsou, G., 2011. Preface of special Issue : Products of Small Ruminants. Small Ruminant Research, 101, 1.
- Gupta, R. K. & Goel, N. K., 1993. Antimicrobial potentials of lactococci – A review. Microbiologie Aliments Nutrition 11, 477-490.

H

- Hansen, E. B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for levained foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78, 119-131.
- Hemme, D. & Foucaud-Scheunemann, C., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal, 17, 467-694.
- Herlinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. & Yvon, M., 2004. Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria to produce Aroma Compounds from Amino Acids. Applied and Environmental Microbiology, 70, 3855-3861.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J. & Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). International Dairy Journal, 13, 469-479.
- Hugenholtz, J., 1993. Citrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12, 165-178.
- Huybens N., Mainil J. & Marlier D., 2009. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. Annales de Médecine Vétérinaire, 153, 112-128.

I

- Irigoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M. & Torre, P., 2007. Influence of un adjunct cultura of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in Roncal-type ewe's-milk cheese. Food Chemistry, 100, 71-80.
- Isolini, D., Grand, M. & Glatti, H., 1990. Selective media for the enumeration of obligately and facultatively heterofermentative lactobacilli. Schweiz Milchwirtschaft Forschung, 19, 57-59.
- Iyer, R., Tomar, S.K., Maheswari, T.U. & Singh, R., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 20, 133-141.

J

- Jany, J.L. & Barbier, G., 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. Food Microbiology, 25, 839-848.

- Jeanson, S., Berthier, F., Grappin, R. & Beuvier, E., 2003. Heat resistance of wild *Lactococcus lactis* strains under a thermal gradient of cooked cheese, in milk and in mini-cheeses. *Lait*, 83, 1-16.
- Jensen, M.A., Webster, A. & Straus, N., 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 945-952.
- Jimeno, J. Lazaro, M.J. & Sollberger, H., 1995. Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401-413.
- Jurkovic, D., Krizkova, L., Sojka, M., Belicova, A., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P. & Vancanneyt, M., 2006. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52, 329-337.
- Justé, A., Thomma, B.P.H.J. & Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25, 745-761.

K

- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 255-262.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H. & De Vos, W.M., 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3390-3393.

L

- Laverde Gomez, J.A., Hendrickx, A.P., Willems, R.J., Top, J., Sava, I., Huebner, J., Witte, W. & Werner, G., 2011. Intra- and Interspecies Genomic Transfer of the *Enterococcus faecalis* Pathogenicity Island. *PLoS ONE* 6(4): e16720. doi:10.1371/journal.pone.0016720
- Ledda, A., Scintu, M.F., Pirisi, A., Sanna, S. & Mannu, L.C., 1994. Caratterizzazione tecnologica di ceppi di lattococchi e di enterococchi per la produzione di formaggio Pecorino Sardo. *Scienza Tecnica Lattiero Casearia*, 45, 443-456.
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.
- Li, W., Raoult, D. & Fournier, P.E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Review*, 33, 892-916.
- Limsowtin G.K.Y, Heap, H.A. & Lawrence, R.C., 1977. A multiple starter concept for cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Technology*, 12, 101-106.
- Linberg, A.-M., Christiansson, A., Rukke, E.-O., Eklund, T. & Molin, G., 1996. Bacterial flora of Norwegian and Swedish semi-hard cheese after ripening, with special reference to *Lactobacillus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 50, 563-572.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. & Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., 1993. Effect of the type of lactic acid starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiology*, 10, 31-41.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetakis, N., 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101, 17-32.
- Lopez-Diaz, T.M., Santos, J.A., Gonzales, C.J., Moreno, B. & Garcia, M.L., 1995. Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft*, 50, 503-504.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., & Whitman, W.B., 2009. Order II Lactobacillales, revised road map to the phylum Firmicutes. ord. nov. In: Devos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., and Whitman, W.B (eds) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, volume 3 (The Firmicutes), p 484. Springer Dordrecht, Heidelberg, Germany.

M

- McSweeney, P.H.L., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N & Cogan, T.M., 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613-634.
- McSweeney, P.H.L., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127-144.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G. & Macalta, F.X., 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology*, 21, 233-240.
- Madera, C., García, P., Janzen T., Rodríguez, A. & Suárez, J.E., 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 213-222.
- Madrau, M.A., Mangia, N.P., Murgia, M.A., Sanna, M.G., Garau, G., Leccis, L., Caredda, M. & Deiana, P., 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal*, 16, 876-885.
- Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 561-588.
- Majcher, M.A., Goderska, K., Pikul, J. & Jele, H. H., 2011. Changes in volatile, sensory and microbial profiles during preparation of smoked ewe cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1416-1423.
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Sanna, M.G. & Deiana, P., 2008. Influence of selected LAB cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids et Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25, 366-377.
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Fancello, F. & Deiana, P., 2013. Suitability of selected autochthonous lactic acid bacteria cultures for Pecorino Sardo Dolce cheese manufacturing: influence on microbial composition, nutritional value and sensory attributes. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 543-551.
- Mannu, L., Comunian, R. & Scintu, M.F., 2000a. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International of Dairy Journal*, 10, 383-389.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M. & Scintu, M.F., 2000b. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 191-197.
- Mannu, L. & Paba, A., 2002. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 55-62.
- Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Fozzi, M.C. & Scintu, M.F., 2002. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 1, 17-26.
- Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T. & Pelaéz, C., 2010. Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*, 20, 18-24
- Martínez, S., Franco, I. & Carballo, J., 2011. Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research*, 101, 41-54.
- Marshall, V.M., 1991. Inoculated ecosystem in a milk environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 127S-135S.
- Mathur, S. & Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacterie – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E. & Elliker, P.R., 1962. A medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655-657.
- Mayo, B., Hardisson, C. & Braña, A.F., 1990. Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from Cabrales cheese. *Journal of Dairy Research*, 57, 125-134.
- Medina, M., Fernandez del Pozo, B., Rodríguez-Marin, M.A., Gaya, P. & Nuñez, M., 1991. Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Science*, 58, 355-361.

- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S. & Oliver, G., 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64, 559-563.
- Medina, M. & Nuñez, M., 2004. Cheeses made from ewes' and goats milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1, 3rd edn, P.F. Fox, ed., Chapman & Hall, London. pp. 279-299.
- Mendia, C., Ibañez, F.J., Torre, P. & Barcina, Y., 2000. Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewes' milk cheese. *Food Control*, 11, 195-200.
- Menéndez, S., Godínez, R., Hermida, M., Centeno, J.A. & Rodríguez-Otero, J.L., 2004. Characteristics of Tetilla pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, 21, 97-104.
- Michel, V. & Martley, F.G., 2001. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese-production and fate of galactose. *Journal of Dairy Research*, 68, 317-325.
- Mills, S., O'Sullivan, O, Hill, C., Fitzgerald, G. & Ross, R.P., 2010. The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics. *International Journal of Technology*, 63, 149-170.
- Monsallier, F., Feutry, F., Bouton, Y., Convert, T., Verdier-Metz, I. & Montel, M.C., 2014. Are bedding materials a source of useful micro-organisms, for dairy cow and ewe milk? JM FAO 2014: Forages resources and ecosystem services provided by Mountain and Mediterranean grasslands and rangelands, Clermont-Ferrand, CIHEAM, 24-26 juin.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. & Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M., 2001. Hydrolysis of caseins and formation of hydrophilic and hydrophobic peptides by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 907-915.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M., 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 13, 201-209.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T. & Brasca, M., 2013. Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Journal of Dairy Research*, 80, 457-466.
- Morea, M., Baruzzi, F. & Cocconcilli, P.S., 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 574-582.
- Mullis, K., Faloona, F., Sharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.

N

- Ndoye, B., Rasolofo, E. A., LaPointe, G. & Roy, D., 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*, 91, 495-524.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J. 1 Golic, N. & Topisirovic, L., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122, 162-170.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L. & Cabezas, L., 2009a. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1505-1517.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L. & Cabezas, L., 2009b. Technological Characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 20, 1092-1098.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L. & Cabezas, L., 2010. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*, 27, 85-93.

- Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón, R., Cabezas L. & Palop L., 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28, 891-899.
- Noller, H.F., 1984. Structure of ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 53, 119-162.
- Nuñez, M., 1976. Flora microbiana des quesos Manchegos elaborados a partir de leche pasteurizada. Composición de un starter para queso Manchego. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Serie General*, 4, 113-121.
- Nuñez, M., Martínez-moreno, J.L. & Medina, A.L., 1981. Ensayo de cepas de *Streptococcus lactis* de diversa actividad acidificante como levainos para queso tipo Manchego. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Serie General*, 12, 65-72.
- Nuñez, J.A., Chavarri, F.J. & Nuñez, M., 1984. Psychrotrophic bacterial flora of raw ewes' milk, with particular reference to Gram negative rods. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 23-29.
- Nuñez M., Medina, M. & Gaya, P., 1989. Ewe's milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research*, 56, 303-321.

O

- Ogier, J.C., Casalta, E., Farraock, C. & Saihi, A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 286-290.
- Ogier, J.C. & Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
- Olarte, C., Sanz, S., Gonzalez-Fandos, E. & Torre, P., 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 421-429.
- Olive, D.M. & Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669.
- Oneca, M., 2002. Caracterización de cepas autóctonas de interés tecnológico en queso con denominación de origen Roncal. Selección de cultivos iniciadores. Thesis. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. Spain.
- Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M. & Torre, P., 2003. PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiology Letters*, 227, 271-277.
- Oneca, M., Ortigosa, M., Irigoyen, A. & Torre, P., 2007. Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: determination of free amino acids by RP-HPLC. *Food Chemistry*, 100, 1602-1610.
- Ordoñez, J.A., Barneto, R. & Mármol, M.P., 1978. Identificación de la flora que participa en la maduración del queso Manchego. *Anales de Bromatología*, 30, 361-373.
- Ortigosa, M., 2002. Influencia de la microbiota láctica en el queso elaborado con leche cruda de oveja. Utilización de cultivos adjuntos. Thesis. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. Spain.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M. & Torre, P., 2006. Effect of *Lactobacillus* adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes' milk cheese. *Food Microbiology*, 23, 591-598.
- Ortigosa, M., Irigoyen, A., Urdin, M., García, S., Ibañez, F.C. & Torre, P., 2008. Sources of enterococci in Idiazábal-type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 146-152.
- Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. & Swings, J., 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251, 267-271.

P

- Passerini, D., Beltramo, C., Coddeville, M., Quentin, Y., Ritzenthaler, P., Daveran Mingot, M.-L. & Le Bourgeois, P., 2010. Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS One*, 5, e15306.
- Parente, E. & Cogan, T. M., 2004. Starter cultures: general aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 3rd ed. Elsevier, Oxford, UK. P. O. Fox (ed.), p. 123-147.

- Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. & Barcina, Y. 1993. Changes in the microflora of Idiazábal cheese with the addition of commercial lactic starters. *Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 10-14.
- Pérez-Elortondo, F.J., Aldámiz, P., Albisu, M. & Barcina, Y., 1998. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 8, 725-732.
- Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. & Barcina, Y., 1999. Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening in Idiazábal cheese. *Lait*, 79, 281-290.
- Pernoud, S., Fremaux, C., Sepulchre, A., Corrieu, G. & Monnet, C., 2004. Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 87, 550-555.
- Phillips, M., Kailasapathy, K. & Tran, L., 2006. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 276-280.
- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I. M.P.L.V.O., Pintado, M.M.E., Gomes, A.M.P. & Malcata, F.X., 2008. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*, 18, 631-640.
- Pirisi, A., Comunian, R., Urgeghe, P.P. & Scintu, M.F., 2011. Sheep's and goat's dairy products in Italy: Technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. *Small Ruminant Research*, 101, 102-112.
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Deplano, M., Corda, A. & Cosentino, S., 2006. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 171-179.
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Deplano, M., Corda, A., Casula, M. & Cosentino, S., 2007. Characterization of Fiore Sardo cheese made with the addition of autochthonous cultures. *Journal of Dairy Research*, 74, 255-261
- Pogačič, T., D'Andrea, M., Kagkli, D.M., Corich, V., Giacomini, A., Baldan, E., Čanžek Majhenic, A., Obermajer, T., Rogelj, I. & Samaržija, D., 2011. Biodiversity of microbial consortia isolated from traditional fresh sheep cheese Karakačanski skakutanac. *Mljekartstvo*, 61, 208-209.
- Pouillet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P. & Larriba, G., 1991. Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal Dairy Research*, 58, 231-238.
- Poveda, J.M., Sousa, M.J., Cabezas, L. & McSweeney, P.L.H., 2003. Preliminary observations in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*, 13, 169-178.
- Prodromou, K., Thashitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, 2001. Microbiology of Orinotyri, a ewe's milk cheese from the Greek mountains. *Food Microbiology*, 20, 575-582.
- Psoni L, Kotzamanidis C, Yiangou M, Tzanetakis N. & Litopoulou-Tzanetaki E., 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 211-220.

Q

- Quere, F., Deschamps, A. & Urdaci, M.C., 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 783-790.
- Quigley, L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Cotter, P.D., 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. Review. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 81-94.
- Quigley, L., O'Sullivan O., Stanton, C., Beresford T.P., Ross, R.P., Fitzgerald G.F. & Cotter, P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology Review*, 37, 664-698.

R

- Rademaker, J. L. W., Herbet, H., Starrenburg, M.J.C., Naser, S.M., Gevers, D., Kelly, W.J., Hugenholtz, J., Swings, J. & van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2007. Diversity analysis of dairy and non-dairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7128-7137.

- Randazzo, C.L., Vaughan, E.E. & Caggia, C., 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 1-8.
- Randazzo .C.L., Caggia, C. & Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1-9.
- Rehman, S.U., McSweeney, P.L.H., Banks, J.M., Brechany, E.Y., Muir, D.D. & Fox, P.F., 2000. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 33-44.
- Reis, P.J.M. & Malcata, F.X., 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101, 122-133.
- Renes, E., Diezhandino, I., Fernández, D., Ferrazza, R.E., Tornadijo, M.E. & Fresno, J.M., 2014. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food microbiology*, 44, 271-277.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M. & Medina, M., 1998. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 129-132.
- Rua, B., Olivares, J.C., Romero, J.R., Aldámiz-Etchebarría, P., 1993. Diseño de un cultivo iniciador para el queso Idiazábal. *Alimentary Equipment and Technology*, 6, 53-56.

S

- Salméron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. & Barrón, L.J.R., 2002. Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food Microbiology*, 19, 167-174.
- Sánchez, M.M., Delgado, T., Alonso, L. & Mayo, B., 2000. Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 17, 449-460.
- Sánchez, J.I., Martínez, B. & Rodríguez, A., 2005. Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 377-387.
- Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J.M., Cabezas, L. & Palop, L., 2006. Genetic diversity, dynamics and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 265-273.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L., 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 125-136.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M. & Beimfohr, C., 1995. Application of molecular methods for the classification and Identification of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 5, 1081-1094.
- Scintu, M.F. & Piredda, G., 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research*, 68, 221-231.
- Smit, G., Smit, B.A. & Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591-610.
- Slanetz, L.W. & Bartley C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology*, 74, 591-596.
- Sousa, M.J. & Malcata, F.X., 1997. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and biochemical characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 74-81.
- Stern M.J., Ames, G.F., Smith, N.H., Robinson, E.C. & Higgins, C.F., 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37, 1015-1026.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-29.

- Stokes, D., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Coffey, A., 2001. Application of *Streptococcus thermophilus* DPC1842 as an adjunct to counteract bacteriophage disruption in a predominantly lactococcal Cheddar cheese starter: use in bulk starter culture systems. *Lait*, 81, 327-334.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W. & Taylor, S.L., 1991. Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: a review. *Journal of Food Protection*, 6, 408-475.
- Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I. & Swings, J., 2005. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 247, 59-63.
- Szczepańska, A.K., Hejnowicz, M.S., Kołakowski, P. & Bardowski, J., 2007. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment. *Acta Biochimica Polonica*, 54, 151-158.

T

- Taïbi, A., Dabour, N., Lamoureux, M., Roy, D. & La Pointe, G., 2010. Evaluation of the genetic polymorphism among *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains using comparative genomic hybridization and multilocus sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 20-28.
- Tavaria, F.K., & Malcata, F.X., 1998. On the Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protégée region. *Journal of Food Protection*, 61, 601-607.
- Tavaria, F.K., & Malcata, F.X., 2000. On the Microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiology*, 17, 293-304.
- Temmerman, R., Huys, G. & Swings, J., 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 348-359.
- Terzaghi, B.E. & Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807-813.
- Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M. & Topisirovic, L., 2007. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 36-42.
- Thompson, T.L. & Marth, E.H., 1986. Changes in parmesan cheese during ripening: microflora coliforms, enterococci, anaerobes, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft*, 41, 201-205.
- Tobes, R. & Ramos, J.L., 2005. REP code: defining bacterial identity in extagenic space. *Environmental Microbiology*, 7, 225-228.
- Turchi, B., Van Tassel, M.L., Lee, A., Nuvoloni, R., Cerri, D. & Miller, M.J., 2013. Phenotypic and genetic diversity of wild *Lactococcus lactis* isolated from traditional Pecorino cheeses of Tuscany. *Journal of Dairy Science*, 96, 3558-3563.
- Turner, N., Sandine, W.E., Elliker, P.R., 1962. An agar medium for differentiating *Streptococcus lactis* and *S. cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 45, 656.

U

- Urbach, E., Daniels, B., Salama, M., Sandine, W. E. & Giovannoni, S. J., 1997. The *ldh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 694-702.

V

- Van de Peer, Y., Chapelle, S. & De Wachter, R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24, 3381-3391.
- van Hylckama Vlieg, J.E., Rademaker, J.L.W., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W.J. & Siezen, R.J., 2006. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 183-190.
- Vassiliadis, A., Psoni, L., Nikolaou, S., Arvanitis, L., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E., 2009. Changes in microbial populations, kinds of lactic acid bacteria and biochemical characteristics of Greek traditional feta cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 39-47.

- Vedamuthu, E.R., 1994. The dairy *Leuconostoc* - use in dairy-products. *Journal of Dairy Science*, 77, 2725-2737.
- Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, T.P., Fox, P.F. & Massa, S., 2008. Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. *Dairy Science and Technology*, 88, 619-629.
- Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 6823-6831.

W

- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. & Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261-5267.
- Wilhelm, N., Le Coustumier, A., Fevrier, F., Le Flèche, A., Grasmick, C. & Grimont, P., 2005. Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine : Quelles solutions? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine. *Spectra Biologie*, 145, 49-54.
- Williams J.G.K., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wolfgang, L., 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematic and identification. *International Journal of Food microbiology*, 120, 225-236.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. & Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.

Z

- Zamfir, M., Vanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., & De Vuyst, L., 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic Applied Microbiology*, 29, 487-495.
- Zora, M. & Snezana, B., 2008. Sensory evaluation and microbiological characterization of autochthonous sombor cheese. *Acta Veterinaria*, 58, 531-541.